

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

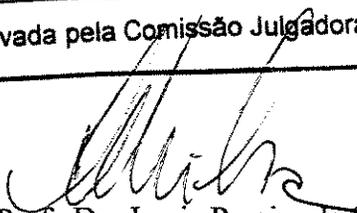


LEONARDO DOS REIS SILVEIRA

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO
ATRAVÉS DE SONDAS FLUORESCENTES *IN VITRO* UTILIZANDO CULTURAS DE
CÉLULAS MUSCULARES E MÚSCULOS ISOLADOS E SUA APLICAÇÃO *IN VIVO*
COM A TÉCNICA DE MICRODIÁLISE.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Leonardo dos Reis Silveira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.


Orientadora: Profª Dra Lucia Pereira da Silva

2003

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANT

NUMERO	127
CHAMADA	T/UNICAMP
	Si39d
EX	
DMBO BC/	53022
ROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REÇO	R\$ 11,00
ATA	08/04/03
CPD	

CM00180991-1

1B 10 287637

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si39d

Silveira, Leonardo dos Reis

Determinação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico através de sondas fluorescentes *in vitro* utilizando culturas de células musculares e músculos isolados e sua aplicação *in vivo* com a técnica de microdiálise. Leonardo dos Reis Silveira.--
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

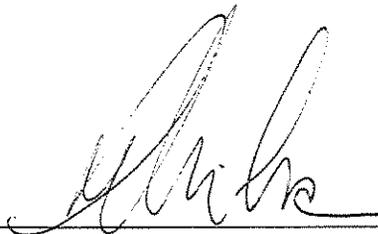
Orientadora: Lucia Pereira da Silva
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1.Músculo. 2.Óxido nítrico. 3.Peróxido de hidrogênio. I. Silva, Lúcia Pereira da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.Título.

Campinas, 10 de Janeiro de 2003.

BANCA EXAMINADORA:

Profª Dra Lucia Pereira da Silva



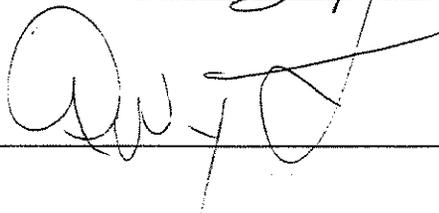
Prof Dr Everardo Magalhães Carneiro



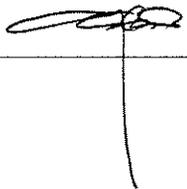
Prof. Dra Dora Maria Grassi Kassis



Prof. Dr Eduardo Kokubun



Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos



2003.01.14.3

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Lucia Pereira da Silva pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho, pela competência e seriedade que conduziu este estudo, pela dedicação e por todas as discussões agradáveis que tivemos sobre Bioquímica durante esse período.

A Profa. Dra. Ylva Hellesten e ao Prof. Dr. Jens Bangsbo do Instituto August Krogh, Universidade de Copenhagen pela co-orientação, pela magnífica oportunidade, pelo incentivo e pela brilhante forma com que me ajudaram a conduzir este estudo. Aos demais professores deste instituto Dr. Carsten Juel e Dr. Jorgen F. P. Wojtaszewski pela ajuda, pelas orientações e por gentilmente disponibilizar espaço em seus respectivos laboratórios para execução desses experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco S. Bonafé por ter gentilmente cedido seu laboratório para escrita final deste trabalho e por todas as discussões sobre Bioquímica que tivemos ao longo desse período.

A Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Bioquímica do Exercício.

Ao Prof. Dr. Everardo M. Carneiro pelo constante incentivo e pelos preciosos conselhos durante todo período de Pós-graduação.

Agradeço também a todos os colegas e amigos da UNICAMP incluindo Armindo, Daniel, Neto, Joaquim Neto, Soraia, Cláudio, Leandro, Freed, Fernando, Juliana, José Luiz, Aílton e Gustavo. E em especial a Andréia Vigilato e Marina A. Cruz pela amizade e por todo serviço prestado.

A todos os colegas e amigos do Instituto August Krogh, Merete, Karina, Ingelise, Jen Lynge e Thore.

Especialmente a minha esposa Tatiane Ramos Santos Silveira e a minha filha Luma R. Silveira a quem dedico este trabalho pelo apoio, sacrifício, compreensão e pela ajuda incondicional.

A todos amigos, pais e família que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado. A CAPES pelo suporte financeiro e a Deus por mais essa grande oportunidade.

Um dia, é preciso parar de sonhar e partir.

Amir Klink

*Dedico este trabalho a minha esposa Tatiane R. Silveira e a minha
filha Luma Ramos Silveira.*

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 - Determinação intra e extracelular de NO em culturas de células musculares .	10
1.2 - Determinação intra e extracelular do H ₂ O ₂ em culturas de células musculares	12
1.3 - Determinação <i>in vivo</i> da produção de H ₂ O ₂ em combinação com a técnica de microdiálise em músculo esquelético de rato submetido a contrações	13
1.4 -Formação extracelular do radical superóxido em cultura de células musculares e músculo esquelético isolado durante contrações	14
2 – OBJETIVOS	16
3 - MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	17
3.1 – Isolamento e cultura primária de células musculares esqueléticas de rato	17
3.2 - Cultura primária de células musculares	19
3.3 - Estimulação elétrica das culturas de células musculares	20
3.4 - Determinação da atividade da enzima creatina quinase (CK)	20
3.5 - Dosagem de proteína	21
3.6 - Análise estatística	21
4 - MATERIAIS E MÉTODOS ESPECÍFICOS	22
4.1 – DETERMINAÇÃO DE NO <i>IN VITRO</i>	22
4.1.2 - Cultura de células endoteliais	22
4.1.3 - Estimulação química e determinação extracelular do NO em culturas de células endoteliais	23
4.1.4 – Determinação intracelular do NO em cultura de células musculares	24
4.1.5 – Determinação extracelular do NO em cultura de células musculares	25

4.2 – DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ <i>IN VITRO</i>	25
4.2.1 - Experimentos <i>in vitro</i> na ausência de células.....	26
4.2.2 – Determinação extracelular do H ₂ O ₂	26
4.2.3 - Determinação intracelular do H ₂ O ₂	27
4.3 – DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ <i>IN VIVO</i>	27
4.3.1 - Efeito antioxidante da CAT e GSH-PX na oxidação do DCFH <i>in vitro</i>	28
4.3.2 - Experimentos <i>in vitro</i> através da técnica de microdiálise	28
4.3.2.1 - Membrana de microdiálise	28
4.3.2.2 – Curva padrão	29
4.3.3 - Experimentos <i>in vivo</i>	30
4.3.4 - Estimulação elétrica	31
4.3.5 – Determinação dos níveis de força	31
<hr/>	
4.4 - DETERMINAÇÃO DO RADICAL O₂^{•-} <i>IN VITRO</i>	32
4.4.1 - Experimentos <i>in vitro</i> na ausência de células	32
4.4.1.2 - Formação do radical ânion superóxido (O ₂ ^{•-})	32
4.4.1.3 - Detecção do O ₂ ^{•-}	32
4.4.2 - Isolamento de neutrófilos	33
4.4.2.1 - Detecção do superóxido em neutrófilos	33
4.4.3 - Experimentos com músculos isolados	35
4.4.4 – Estimulação elétrica de músculo isolado	36
4.4.5 - Detecção do radical O ₂ ^{•-}	37
4.4.6 - Experimentos em culturas de células	37
4.4.6.1 - Estimulação elétrica das culturas de células	37
4.4.6.2 - Detecção do O ₂ ^{•-} em culturas de células musculares	37

5 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO NO <i>IN VITRO</i>	38
5.1 – Níveis extracelulares de CK	38
5.2 – Determinação de NO <i>in vitro</i> na ausência de células	39
5.3 – Efeito do NO na intensidade de fluorescência do DAF-2 na ausência de células	40
5.4 – Determinação do NO em culturas de células endoteliais	41
5.5 – Efeito da intensidade de estimulação elétrica na produção intracelular de NO	42
5.6 – Efeito da intensidade de estimulação elétrica na produção extracelular de NO	43
5.7 – Efeito do substrato arginina na produção intracelular do NO em cultura de célula.....	44
 6 – DISCUSSÃO	45
 7 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ <i>IN VITRO</i>	48
7.1 – Determinação do H ₂ O ₂ <i>in vitro</i> na ausência de células	48
7.2 – Efeito de diferentes EROs e NO na oxidação do DCFH	49
7.3 – Efeito da intensidade de estimulação elétrica na oxidação intracelular do DCFH	50
7.4 – Efeito de diferentes antioxidantes na oxidação intracelular do DCFH	51
7.5 – Efeito da intensidade de estimulação elétrica na oxidação extracelular do DCFH	52
7.6 – Efeito de diferentes antioxidantes na oxidação extracelular do DCFH	53
 8 – DICUSSÃO	54

9 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ <i>IN VIVO</i>	58
9.1 - Oxidação <i>in vitro</i> do DCFH-BSA	58
9.2 – Oxidação <i>in vitro</i> do DCFH	59
9.3 - Determinação <i>in vivo</i> dos níveis de H ₂ O ₂ pela oxidação do DCFH-BSA através da técnica de microdiálise	60
9.4 - Efeito da CAT na oxidação do DCFH-BSA através da técnica de microdiálise <i>in vivo</i>	61
9.5 - Efeito da GSH-PX na oxidação do DCFH-BSA através da técnica de microdiálise <i>in vivo</i>	62
9.6 - Níveis de força muscular durante a estimulação elétrica	63
10 – DISCUSSÃO	64
11 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO RADICAL O₂^{•-} <i>IN VITRO</i> ..	67
11.1 – Determinação do radical O ₂ ^{•-} <i>in vitro</i> na ausência de células	67
11.2 – Efeito de diferentes EROs na intensidade de fluorescência do nitróxido	68
11.3 – Determinação extracelular do radical O ₂ ^{•-} em neutrófilos isolados	69
11.4 – Liberação extracelular do radical O ₂ ^{•-} em culturas de células musculares ...	70
11.5 – Liberação extracelular do radical O ₂ ^{•-} em músculo esquelético isolado	71
11.6 - Níveis de força muscular durante a estimulação elétrica	72
12 – DISCUSSÃO	73
13 – CONCLUSÃO GERAL	76
14 – CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	76
15 - REFERÊNCIAS	78

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1 – Produção científica versus estresse oxidativo, radicais livres e antioxidantes.

Figura 2 - Vias de formação intra e extracelular de EROs e ERNs em células de músculo esquelético.

Figura 3: Isolamento e cultura primária de células musculares esqueléticas de rato.

Figura 4 - Cultura primária de células musculares.

Figura 5 - Modelo dos experimentos com microdiálise *in vitro*.

Figura 6 - Isolamento de neutrófilos humanos.

Figura 7 - Níveis extracelulares de CK.

Figura 8 - Determinação de NO *in vitro* na ausência de células.

Figura 9 - Efeito do NO na intensidade de fluorescência do DAF-2 na ausência de células.

Figura 10 - Determinação de NO em culturas de células endoteliais.

Figura 11 - Efeito da intensidade de estimulação na produção intracelular de NO.

Figura 12 - Efeito da intensidade de estimulação na produção extracelular de NO.

Figura 13 - Efeito da arginina e do radical superóxido na produção intracelular de NO.

Figura 14 - Determinação do H₂O₂ *in vitro* na ausência de células.

Figura 15 - Efeito de diferentes EROs e NO na oxidação do DCFH.

Figura 16 - Efeito da intensidade de estimulação elétrica na oxidação intracelular do DCFH.

Figura 17 - Efeito de diferentes antioxidantes na oxidação intracelular do DCFH.

Figura 18 - Efeito da intensidade de estimulação elétrica na oxidação extracelular do DCFH.

Figura 19 - Efeito de diferentes antioxidantes na oxidação extracelular do DCFH.

Figura 20 - Oxidação *in vitro* do DCFH-BSA.

Figura 21 - Determinação *in vivo* dos níveis de H₂O₂ pela oxidação do DCFH-BSA através da técnica de microdiálise

Figura 22 – Efeito da CAT na oxidação do DCFH-BSA através da técnica de microdiálise *in vivo*.

Figura 23 – Efeito da GSH-PX na oxidação do DCFH-BSA através da técnica de microdiálise *in vivo*.

Figura 24 - Determinação do radical $O_2^{\cdot -}$ *in vitro* na ausência de células.

Figura 25 - Efeito de diferentes EROs na intensidade de fluorescência do nitróxido.

Figura 26 - Determinação extracelular do radical $O_2^{\cdot -}$ em neutrófilos isolados.

Figura 27 - Liberação extracelular do radical $O_2^{\cdot -}$ em culturas de células musculares.

Figura 28 - Liberação extracelular do radical $O_2^{\cdot -}$ em músculo esquelético isolado.

Tabela I - Oxidação *in vitro* do DCFH.

Tabela II - Níveis de força muscular média e máxima durante a estimulação elétrica *in vivo*.

Tabela III - Níveis de força muscular média e máxima entre os músculos sóleo e EDL submetidos a contrações.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS:

CAT- catalase

DAF-2- 4,5-diaminofluoresceína

DAF-2-DA- 4,5-diaminofluoresceína-diacetato

DCFH- 2,7-Diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA- 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato

D-fenil- D-fenilalanina

DMSO- dimetilsulfóxido

EDL – extensor digital longo

GSH- glutationa

GSH-PX- glutationa peroxidase

Hb- hemoglobina

L-NA- N^G-nitro-L-arginina

O₂^{·-}- radical ânion superóxido

·OH- radical hidroxila

·ONOO- peróxido nitrito

NO- óxido nítrico

NOS- óxido nítrico sintase

EROs- espécies reativas de oxigênio

SOD- superóxido dismutase

SNAP- S-nitrosotiol doador de NO

SNP- nitroprussiato de sódio

XO- xantina oxidase

XA - xantina

DMEM - meio eagle modificado por Dulbecco

DPBS - tampão fosfato-salina de Dulbecco

Hepes – (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N´-[2-ácido etanosulfônico])

Tris-HCl – Hidrocloreto de Tris – (hidroximetil) aminometano

HBSS - solução salina balanceada de Hank

DTPA - ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA)

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

PMA - forbol 12-miriestato 13-acetato

RESUMO

Embora níveis moderados de EROs e NO possam exercer importantes funções fisiológicas no tecido muscular, como regulação do fluxo sanguíneo, angiogênese e aumento da força de contração, pouco é conhecido a respeito da formação intracelular de EROs e NO durante a atividade muscular. Por outro lado, uma excessiva produção dessas espécies pode ser prejudicial ao nosso organismo, superando a capacidade do sistema de defesa antioxidante e conduzindo a um desequilíbrio no estado redox intracelular. Em nosso estudo, examinamos a formação intra e extracelular do NO e H₂O₂ em culturas de células, a formação extracelular do H₂O₂ em músculo esquelético de rato *in vivo* e a formação de O₂^{•-} em culturas de células e músculos isolados. Para realização deste estudo nós utilizamos as sondas fluorescentes DAF-2-DA (reativa ao NO), DCFH-DA (reativa ao H₂O₂) e fluoróforo nitróxido (reativa ao O₂^{•-}). Nossos resultados *in vitro* usando culturas de células musculares mostraram que o H₂O₂ e NO são formados em grandes quantidades no meio intracelular, seguido de um grande efluxo para o espaço extracelular durante atividade muscular intensa (P < 0,05). Por outro lado, durante atividade muscular moderada a produção dessas espécies é mantida em níveis basais sem nenhuma alteração significativa na sua produção (P > 0,05). Os resultados *in vitro* utilizando cultura de célula e músculos sóleo e EDL isolados mostraram um alto efluxo do O₂^{•-} do meio intra para o meio extracelular durante contrações intensas (P < 0,05). O músculo EDL apresentou um maior efluxo do O₂^{•-} quando comparado que o músculo sóleo (P < 0,05). Os resultados *in vivo* utilizando o DCFH em combinação com a técnica de microdiálise mostraram uma alta detecção de H₂O₂ no meio intersticial quando os valores de repouso foram comparados com os valores durante a atividade muscular intensa, sugerindo um alto efluxo dessa espécie do meio intra para o meio extracelular. Nossos resultados mostram que estas sondas fluorescentes utilizadas em nosso estudo são de grande sensibilidade e especificidade na detecção de EROs e NO em tecido muscular submetido a contrações. Em adição, nossos resultados sugerem que a atividade muscular intensa aumenta significativamente a produção de EROs e NO e que essas espécies produzidas intracelularmente são amplamente transportadas para o meio extracelular, processo que protege as células contra os possíveis ataques oxidativos intracelulares gerados por essas espécies.

ABSTRACT

Although moderate levels of ROS and NO may exert important physiological functions in muscle tissue, such as regulation of blood flow, angiogenesis and contractile force, little is still known about ROS and NO formation in response to muscle activity. In addition, an excessive level of these species may be harmful as it may overcome the antioxidant capacity, leading to oxidative stress. In this study we examined intra- and extracellular H_2O_2 and NO formation during contractions in primary rat skeletal muscle cell culture and isolated muscle. The fluorescent probes DCFH-DA/DCFH (2,7-Dichlorofluorescein-diacetate/2,7-Dichlorofluorescein) and DAF-2-DA/DAF-2 (4,5-diaminofluorescein-diacetate/4,5-diaminofluorescein) were used to detect H_2O_2 and NO, respectively. Intense electrical stimulation of muscle cells increased the intra- and extracellular DCFH fluorescence by 171% and 105% respectively, compared with control non-stimulated cells ($P < 0.05$). Addition of glutathione (GSH) or tiron prior to electrical stimulation inhibited the intracellular DCFH oxidation ($P < 0.05$), whereas addition of GSH-PX + GSH inhibited the extracellular DCFH oxidation ($P < 0.05$). Intense electrical stimulation also increased ($P < 0.05$) the intra- and extracellular DAF-2 fluorescence signal by 56% and 20%, respectively. Addition of N^G -nitro-L-arginine (L-NA) completely removed the intra- and extracellular DAF-2 fluorescent signal. In isolated muscles intense stimulation increase superoxide release compared with control non-stimulated ($P < 0.05$). H_2O_2 detection in vivo through DCFH-BSA combined with microdialysis technique showed a significant increase on DCFH oxidation during intense contractions. GSH-PX antioxidant completely inhibited DCFH oxidation. The current results show that H_2O_2 , NO and O_2^- are formed in skeletal muscle cells during contractions. Our results also suggest that a rapid release of these species may constitute an important defense mechanism against the formation of intracellular $\cdot OH$ and $\cdot ONOO$. Furthermore, our data show that DCFH and DAF-2 are suitable probes for the detection of ROS and NO both intra- and extra-cellularly in skeletal muscle cell cultures.

1 – INTRODUÇÃO:

Há cerca de 2,4 bilhões de anos atrás, surgiram os primeiros organismos aeróbios e o surgimento destes organismos foi considerado um grande marco na história da evolução biológica, pois a utilização do O_2 como acceptor final de elétrons no processo de fosforilação oxidativa aumentou consideravelmente a eficiência na produção de energia a partir dos alimentos (Ji, 1999). Ao compararmos a oxidação aeróbia da molécula de glicose com sua oxidação anaeróbia veremos que no primeiro caso a produção de energia é da ordem de 12 vezes maior. Portanto, sendo a glicose um elemento essencial em nossa dieta, teríamos que ingerir cerca de 12 vezes mais alimentos do que normalmente ingerimos diariamente se não fôssemos, é claro, organismos aeróbios (Meneghini, 1987). Porém, embora o O_2 desempenhe um papel fundamental no processo de fosforilação oxidativa permitindo nosso organismo utilizar a energia proveniente de nutrientes como carboidratos, lipídios e proteínas com maior eficiência, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial é transformada em espécies reativas de oxigênio (EROs) (Chance et. al., 1979; Ji, 1999). A formação dessas espécies foi inicialmente demonstrada com o clássico estudo de McCord & Fridovich (1968), mostrando a formação do radical $O_2^{\cdot -}$ pela enzima xantina oxidase. Anos depois, estes mesmos autores demonstraram ainda que as EROs são causadoras de danos oxidativos aos tecidos em organismos vivos e que certos antioxidantes podem proteger os tecidos contra esses danos (McCord, 1974; McCord & Fridovich (1969). A partir de então, houve um grande avanço nas investigações envolvendo a formação de EROs em organismos vivos, como demonstrado pelo grande número de citações nessa área nos dias atuais (figura 1). No entanto, é preciso destacar que, em condições normais, durante a fosforilação oxidativa a redução do O_2 molecular para H_2O requer 4 elétrons e pode ocorrer por 2 diferentes vias. A primeira e principal via de redução tetravalente do O_2 ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, sendo a reação catalisada pela citocromo oxidase como o passo final desse processo. Nesse caso, nenhum intermediário de O_2 é formado e a redução tetravalente do O_2 foi calculada em aproximadamente 95-98% do total de O_2 consumido (Ernster, 1986). Na segunda via, a fração restante de 2-5% pode dar origem à formação de EROs pela redução univalente da molécula de O_2 como descrito pelas seguintes reações:

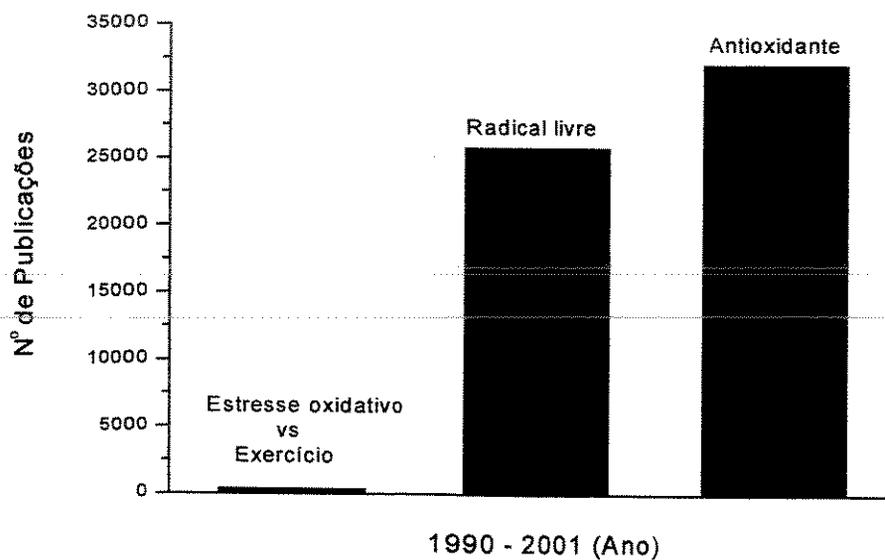
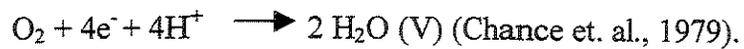
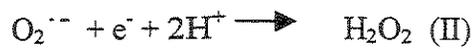
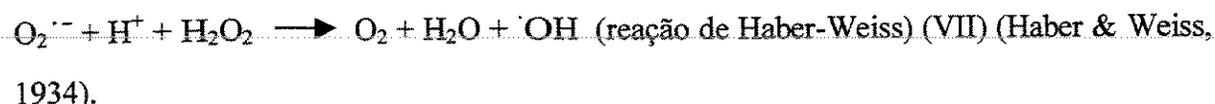
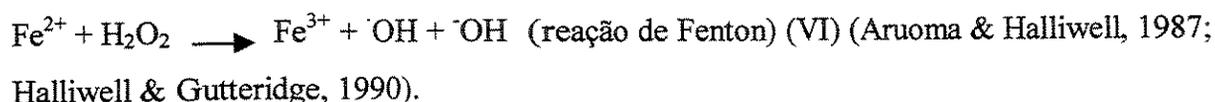


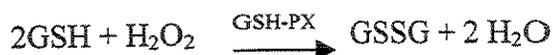
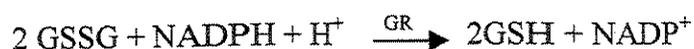
Figura 1: Número de publicações existentes na base de dados “Medline” entre os anos de 1990 e 2001, quando os termos “Estresse oxidativo vs Exercício”, “Radical livre” e “Antioxidante” foram cruzados.

Entre as espécies reativas de O₂ mais comuns podemos citar o radical ânion superóxido (O₂^{·-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (·OH) (Halliwell & Gutteridge, 1989). O O₂^{·-} e ·OH são classificados como radicais livres de O₂ devido a presença de um elétron desemparelhado em sua estrutura atômica, enquanto o H₂O₂, O₂^{·-} e ·OH coletivamente são classificados como EROs. Então, por definição os radicais livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo, conseqüentemente fazendo deles espécies altamente reativas. Entre as EROs o radical ·OH é considerado o mais potente oxidante em sistemas biológicos, com um tempo de vida extremamente curto (1 x 10⁻⁹ s) e com uma alta reatividade a uma grande variedade de moléculas orgânicas (Yu, 1994). Além da sua geração na cadeia de transporte de elétrons, o radical ·OH pode ainda ser formado por duas diferentes vias em organismos vivos como descrito nas reações abaixo:



Embora a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial seja reconhecidamente um dos principais sítios de produção de EROs durante o exercício (Freeman & Crapo, 1982), outras diferentes fontes podem produzir estas espécies. (1) Neutrófilos: durante o “burst” respiratório podem gerar grandes quantidades de EROs para destruição de bactérias, virus e outros agentes infecciosos (Pyne, 1994). (2) Peroxissomos: nessas organelas a produção de H₂O₂ pode ser substancialmente aumentada quando uma grande quantidade de ácidos graxos de cadeias longas são metabolizados via β-oxidação (Chance et. al., 1979). (3) Xantina oxidase: durante isquemia a molécula de AMP é continuamente degradada à hipoxantina, podendo em seguida ser convertida para xantina e ácido úrico pela xantina oxidase. Nessa conversão a enzima xantina oxidase usa o oxigênio como acceptor final de elétrons, podendo dessa maneira formar o O₂^{·-} (Downey, 1990). Outras fontes de EROs incluem ainda o citocromo P450 (Yu, 1994) e a via de formação do ácido araquidônico

(Kuehl & Egan, 1980). Embora os neutrófilos saibam aproveitar o potencial oxidante das EROs para protegerem nosso organismo contra bactérias e outros microrganismos, evidências sugerem que altos níveis de EROs podem causar sérios distúrbios no estado redox do nosso organismo, incluindo principalmente o tecido muscular durante contrações intensas (Clanton et. al., 1999). Esse efeito deletério das EROs é conhecido como estresse oxidativo e quando ocorre, diferentes componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA podem sofrer oxidação devido ao ataque das EROs comprometendo as principais funções celulares. Então, a falha na remoção dessas espécies durante o exercício pode resultar em um significativo dano oxidativo aos componentes celulares. Porém, não é surpreendente que nosso organismo, incluindo as células musculares possua um sofisticado sistema antioxidante para se proteger contra as ações deletérias dos radicais livres. Esse sistema de proteção antioxidante pode ser enzimático ou não enzimático, os quais trabalham em conjunto para minimizar os efeitos das EROs nos tecidos (Davies, 1988). O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) e a catalase (CAT). Estas enzimas, como exemplificado nas reações abaixo, são responsáveis pela remoção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. O sistema antioxidante não enzimático inclui as vitaminas E, C, e A, glutathione reduzida (GSH), ubiquinona, ácido úrico, L-cisteína, fenilalanina e glicose (Yu, 1994). Muitos destes antioxidantes podem estar estrategicamente compartimentalizados em organelas subcelulares para proporcionarem o máximo de proteção contra os danos causados pelas EROs.

Superóxido dismutase:**Catalase:****Glutationa peroxidase:****Glutationa redutase:**

Outra importante espécie reativa é o óxido nítrico (NO), porém agora, com sua origem proveniente do nitrogênio (espécie reativa de nitrogênio, ERN). O NO possui importantes funções biológicas incluindo as funções neurotransmissora, vasodilatadora, imunológica e metabólica (Fujii et. al., 1998; Bredt, 1999). O NO é gerado a partir dos substratos arginina e O_2 por uma família de 3 isoformas da óxido nítrico sintase (NOS): NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e a NOS induzível (iNOS) (figura 2). Estudos anteriores têm mostrado que essas isoformas exibem uma ampla distribuição tecidual incluindo o tecido muscular esquelético (Knowles & Moncada, 1994; Kobzik, 1994; Boczkowski et. al., 1996). O NO é consideravelmente menos reativo que o radical $\cdot\text{OH}$, porém sua interação com o $\text{O}_2^{\cdot -}$ produz outra ERN, o peróxido nitrito (ONOO^-), capaz de se decompor produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico, como descrito na reação VIII. Ao contrário de outras EROs e a exemplo do $\cdot\text{OH}$, o NO bem como o ONOO^- não possuem uma enzima antioxidante específica sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos e principalmente pelas concentrações de $\text{O}_2^{\cdot -}$ disponíveis (Rao et. al., 1992; Kooy et. al., 1997) (figura 2).



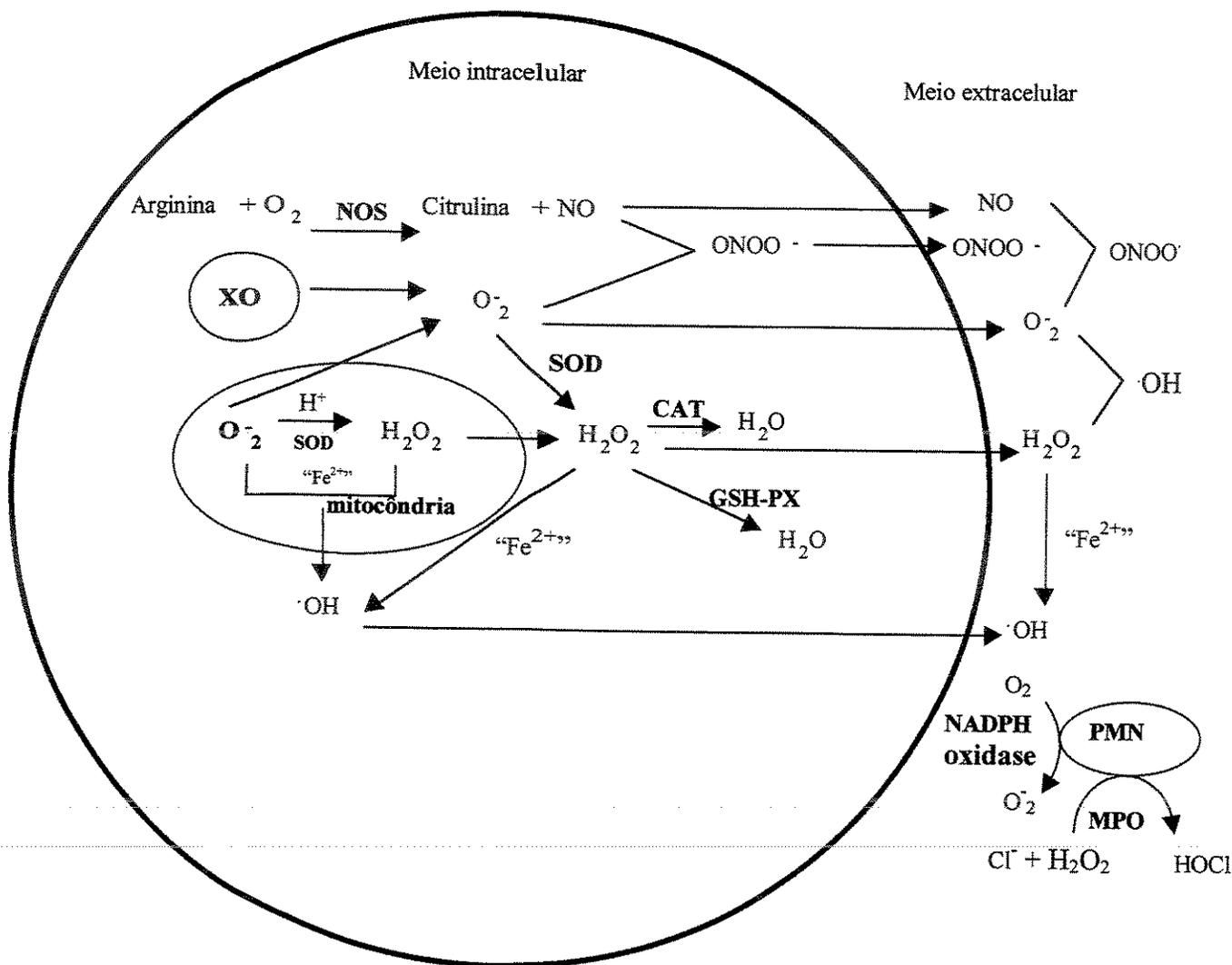


Figura 2: Principais vias de formação intra e extracelular de EROs e ERNs em células do músculo esquelético. As abreviações e símbolos são definidos como: NOS (óxido nítrico sintase), NO (óxido nítrico), ONOO⁻ (peróxido nitrito), XO (xantina oxidase), O₂⁻ (radical ânion superóxido), PMN (neutrófilos polimorfonucleares), MPO (mieloperoxidase), HOCl (ácido hipoclorídrico), ·OH (radical hidroxila), H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GSH-PX (glutationa peroxidase).

Podemos então agora considerar a molécula de oxigênio como essencial e ao mesmo tempo tóxica ao nosso organismo. Diante desse paradoxo e se isso é realmente verdadeiro, o que dizer do exercício físico onde o consumo de O_2 sistêmico é aumentado em 10 vezes e o intramuscular acima de 100 vezes (Meydani & Evans, 1993)? Se 2 - 5% do O_2 consumido, reconhecidamente dá origem às EROs e se essa relação é sempre mantida, seria então lógico esperar que durante o exercício intenso a formação de EROs aumente proporcionalmente ao consumo de O_2 . Então, com base nessa hipótese seria ainda adequado assumirmos sem nenhuma surpresa que o exercício físico constitui um excelente modelo experimental para estudar a formação de EROs e de suas consequências ao nosso organismo. Apesar do sofisticado sistema de defesa antioxidante, existe atualmente uma série de resultados mostrando a possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo em células de músculos esqueléticos durante o exercício. Usando a técnica de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), Davies et. al. (1982) encontraram um aumento no sinal de EPR em homogenato de músculo de rato previamente submetido a uma sessão de exercício agudo extenuante. De um modo similar, Jackson et. al. (1985) mostraram um aumento de 70% no sinal de EPR em músculo isolado de rato estimulado eletricamente. Reid et. al. (1992), usando o citocromo c como detector do $O_2^{\cdot -}$, verificou um aumento do efluxo dessa espécie para o meio extracelular em músculo diafragma de rato eletricamente estimulado. A especificidade do método ao $O_2^{\cdot -}$ foi demonstrada pela adição de SOD. Em outro estudo, O'Neill et. al. (1996) usando a hidroxilação da fenilalanina demonstraram que o $\cdot OH$ é produzido *in vivo* pelo tecido muscular esquelético. Sem dúvidas, esses resultados proporcionam evidências “diretas” da geração intracelular das EROs. Porém, é importante observar que nas condições em que esses experimentos foram realizados, isto é, utilizando músculo esquelético isolado, homogenato de tecido muscular ou modelo *in vivo*, o tecido vascular, um conhecido sítio de formação de EROs não foi completamente eliminado dificultando a interpretação dos resultados. Portanto, nas condições citadas acima, a determinação de EROs pode não ser representativa da real taxa de EROs produzida pelas células musculares *in vivo*. Em adição, uma limitada quantidade de estudos tem proporcionado evidências “diretas” para a produção de NO em células musculares. Balon & Nadler (1994), usando o método de quimioluminescência encontraram um significativo aumento na produção de NO após estimulação elétrica *in situ* comparado com o controle.

Porém, deve ser considerado que as células endoteliais contém uma grande quantidade de NOS tornando-se assim difícil a interpretação dos resultados em células musculares. Por outro lado, há na literatura um grande número de estudos *in vivo* empregando técnicas de medidas indiretas.

Em uma pesquisa recente na base de dados “Medline” foi constatado que os métodos mais utilizados para medir ataque oxidativo são: a razão GSH/GSSH, quimioluminescência, oxidação de proteínas, malondialdeído (MDA), etano, ácido tiobarbitúrico (TBA), oxidação de DNA e pentano. Outros estudos tem mostrado também evidências indiretas da formação de NO no tecido muscular através da determinação da atividade da enzima NOS (Kobzik et. al., 1994; Reiser et al., 1997; Fujii et. al., 1998; Tidball et. al. 1998). A exemplo dos resultados *in vitro* e como descrito a seguir, embora esses métodos tenham proporcionado evidências de que o músculo esquelético em exercício produz EROs e ERNs, todos eles apresentam limitações metodológicas e alguma análise crítica precisa ser considerada. Atualmente, as análises através desses métodos tem sido feitas em amostras de sangue ou de músculo na forma de homogenato, coletadas após o exercício. Assim, essas análises podem não ser representativas da real ocorrência de ataque oxidativo, uma vez que o consumo de oxigênio e a produção de EROs diminuem rapidamente após 1 a 2 min do término do exercício (O’Neill et. al., 1996), permanecendo a verdadeira taxa de formação de EROs pelas células musculares desconhecida. Em adição, deve-se levar em conta que o tempo de vida dos radicais livres é extremamente curto e ainda a presença do sistema antioxidante como competidor, muitas vezes difícil de eliminar. Outro problema é que em homogenato de tecido muscular, bem como em músculo isolado, o sistema vascular pode estar presente em grande escala dificultando a interpretação dos resultados. De modo similar, amostras sanguíneas podem não ser adequadas para muitas situações experimentais (Lonroth, 1991; Simonsen et. al., 1994). Atualmente, tem sido mostrado que amostras de sangue podem não refletir informações detalhadas sobre as respostas celulares, sendo então, as medidas sanguíneas em muitos casos irrelevantes. A razão para essas discrepâncias pode estar nas diferentes características cinéticas apresentadas pelos compartimentos sanguíneo e intersticial para um mesmo composto quando comparadas (Lonroth, 1991). As EROs, como já bem estabelecido na literatura, possuem um tempo de vida extremamente curto e uma alta reatividade. Portanto, parece difícil acreditar que essas espécies possam escapar do

sistema antioxidante alcançando a circulação sistêmica e posteriormente sejam detectadas neste compartimento. Em um recente artigo de revisão, Jenkins (2000) chamou a atenção ao destacar um fato ocorrido em um determinado laboratório onde os pesquisadores locais após um experimento na tentativa de detectar H_2O_2 exclamaram: “Processamos um animal inteiro e não encontramos vestígio sequer de H_2O_2 !” Na verdade, é importante destacar que o problema não estava no método de detecção utilizado mas sim na capacidade de perceber a rápida eliminação do H_2O_2 nos tecidos bem como na adequação do método à situação experimental.

Com base nos problemas discutidos acima podemos, de forma simples, perceber que a determinação da produção de EROs pelas células musculares durante o exercício realmente não é uma tarefa muito fácil. Isso então, implica que um cuidado especial deve sempre ser tomado antes de decidir o método experimental utilizado e principalmente o tipo de amostra a ser analisado. Em adição, podemos ainda assumir que certos tipos de amostras como homogenato de tecido muscular e sangue parecem definitivamente não ser representativas da produção de EROs pelas células musculares durante o exercício.

Devido a todas essas dificuldades existentes, nos últimos anos muitos estudos tem surgido apresentando métodos cada vez mais atrativos para determinação de EROs. Atualmente, sondas fluorescentes capazes de reagir com as diferentes espécies reativas de O_2 tem sido amplamente utilizadas como método de determinação de ataque oxidativo em leucócitos e outros diferentes tipos de células (Bass et. al., 1983; Szejda et. al., 1984; Burow & Valet, 1987; Kehrer & Paraidathathu, 1992; LeBel et. al., 1992; Carter et. al., 1994; Kojima et. al., 1998; Murrant et. al., 1999). Estas sondas, conhecidas como 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (reativo ao H_2O_2) e 4,5-Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2-DA) (reativo ao NO) apresentam uma grande vantagem em relação aos métodos anteriormente descritos, podendo ser usadas como marcadores oxidativos tanto no meio intracelular como no meio extracelular. Por serem compostos apolares essas sondas difundem-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro da célula o grupo diacetato é facilmente hidrolizado por esterases citosólicas deixando livres as moléculas de DCFH e DAF-2. Dessa forma, proporcionam um excelente substrato ao H_2O_2 e ao NO gerados em excesso durante aumento do metabolismo oxidativo. Outra sonda fluorescente utilizada em nosso estudo foi Proxil

Fluorescamina (fluoróforo-nitróxido), um composto polar capaz de se reduzir à sua correspondente hidroxilamina ao reagir com o superóxido na presença de agentes redutores tem sido apresentado na literatura como uma específica e atraente sonda para detecção do radical superóxido (Finkelstein et. al., 1984; Pou et. al., 1993).

1.1 - DETERMINAÇÃO INTRA E EXTRACELULAR DE NO EM CULTURAS DE CÉLULAS MUSCULARES.

Nos últimos anos houve uma grande expansão nas investigações sobre a produção de NO em células musculares. Esse interesse deve-se principalmente aos importantes papéis do NO em vários processos fisiológicos no tecido muscular, incluindo regulação metabólica, regulação do fluxo sanguíneo, expressão gênica e modulação no processo de contração muscular (Wolin et. al., 1997; Bredt, 1999; Reid, 2001). Apesar de sua importância fisiológica a excessiva produção do NO pelas células musculares durante o exercício pode exercer diferentes efeitos modulatórios no processo de contração. Estudos utilizando músculos diafragma isolados mostram que a força de contratilidade durante contrações submáximas foi aumentada com a inibição da NOS. Por outro lado, o efeito oposto, com diminuição da força submáxima, foi verificado com a adição de doadores de NO (Kobzik et. al., 1994; Andrade et. al., 1996). Embora o mecanismo exato permaneça desconhecido, alguns investigadores sugerem que o NO exerce seus efeitos inibindo diretamente a interação entre o Ca^{++} e os miofilamentos contráteis (Aghdasi et. al., 1997), ou afetando o padrão de deslizamento dos miofilamentos reduzindo a velocidade máxima de encurtamento e diminuindo a atividade da ATPase (Galler et. al., 1997; Perkins et. al., 1997). O NO pode ainda exercer seus múltiplos efeitos indiretamente, diminuindo a produção de energia via redução da respiração mitocondrial, inibindo a atividade da citocromo oxidase (Cleeter et. al., 1994). Seus efeitos indiretos podem ainda causar inibição das enzimas citosólicas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e creatina quinase (Mohr et. al., 1996; Gross et. al., 1996). Em adição, tem sido mostrado que o NO pode interagir com $O_2^{\cdot -}$ formando ONOO, uma potente espécie oxidante, capaz de causar dano oxidativo em diversos compostos intracelulares (Beckman et. al., 1990; Goss et. al., 1999). Em conjunto, esses resultados indicam que o NO exerce um potente efeito inibidor no processo de

contração do músculo esquelético. No entanto, pouco ainda se conhece a respeito da regulação da produção de NO em células musculares, pois grande parte das evidências existentes são “indiretas” via aumento da atividade da NOS (Nakane et. al., 1993; Kobzik et. al., 1994; Frandsen et al. 1996), ou pela utilização direta de doadores de NO (Kobzik et. al., 1994; Andrade et. al., 1996). Por outro lado, uma limitada quantidade de estudos tem proporcionado evidências “diretas” da formação de NO em células musculares. Balon & Nadler (1994) usando um método de quimioluminescência encontrou um significativo aumento na produção de NO após estimulação elétrica *in situ* comparado com o controle não estimulado. Porém, as células endoteliais presentes no tecido vascular tem uma grande quantidade de NOS tornando difícil a interpretação de que o NO fora produzido somente pelas células musculares. Em outro estudo, Tidball et. al. (1998), usando um método espectrofotométrico, verificaram um aumento de 42% na produção de NO em culturas de células musculares estimuladas por pressão. Apesar da detecção dos aumentos significativos na produção de NO, os autores neste estudo não removeram o sinal do marcador de NO utilizado, tornando incerta a especificidade do método. Portanto, por causa das limitações metodológicas, os estudos acima ainda proporcionam poucas evidências de que o NO é produzido pelo músculo esquelético durante contrações. Apesar do grande número de estudos pouco ainda se conhece a respeito da formação do NO em células musculares. Então devido à grande implicação fisiológica do NO em células musculares seria fundamental o estabelecimento de um método capaz de medir a formação de NO nesse tipo de células. Atualmente, a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2-DA/ DAF-2) um detector específico de NO introduzido por Kojima et. al. (1998) vem sendo amplamente utilizada em sistemas biológicos (Nakatsubo et. al., 1998; López-Figueroa et. al., 2000). Sua grande vantagem é que o DAF-2-DA é um composto apolar e pode facilmente atravessar a membrana celular. Uma vez no seu interior a molécula de diacetato (DA) é rapidamente hidrolizada por esterases citosólicas. O DAF-2 formado prende seletivamente o NO entre dois grupos amino em sua molécula produzindo o composto fluorescente triazolofluoresceína.

1.2 - DETERMINAÇÃO INTRA E EXTRACELULAR DO H₂O₂ EM CULTURAS DE CÉLULAS MUSCULARES.

Estudos anteriores usando ressonância paramagnética de elétrons (EPR) já proporcionaram evidências de que as EROs são formadas no tecido muscular durante contrações (Davies et. al. 1982; Jackson et. al., 1985). Porém, estes autores não foram capazes de identificar as EROs produzidas durante o processo de contração muscular. Em contraste, Reid et al. (1992), utilizando o citocromo c como detector do O₂^{·-} em músculo diafragma de rato estimulado eletricamente, mostraram um significativo aumento na liberação extracelular do O₂^{·-} comparado como o controle não estimulado. Resultados similares foram verificados por McArdle et. al. (2001) em músculo sóleo incubado com citocromo c como detector do radical O₂^{·-}. O'Neill et. al. (1996), usando a hidroxilação da fenilalanina demonstraram que o ·OH é produzido *in situ* pelo músculo esquelético durante contrações. Apesar da identificação das EROs envolvidas, estes estudos foram conduzidos em modelos experimentais utilizando músculo esquelético isolado ou animais intactos. Nessas condições, o tecido vascular, um importante sítio de produção de EROs, não pode ser completamente isolado, tornando questionável a fonte principal de formação de EROs durante as contrações musculares. Em adição, a formação do H₂O₂, uma das mais importantes EROs, ainda não foi mostrada em músculo esquelético. Embora o H₂O₂ não seja um radical livre, tem sido considerado uma das mais importantes EROs devido a sua alta capacidade de difusão extracelular (Yu, 1994) e também pela sua alta capacidade de gerar o radical ·OH, altamente reativo, via reação de Fenton (Aruoma & Halliwell, 1987) ou reação de Haber-Weiss (Haber & Weiss, 1934).

O uso do 2,7-Diclorofluorescein diacetato (DCFH-DA) foi originalmente descrito por Keston & Brandt (1965) como um método fluorescente para determinação de H₂O₂. Por ser um composto apolar, pode atravessar facilmente a membrana celular e uma vez dentro das células o DCFH-DA é hidrolizado por esterases citosólicas no composto hidrofílico DCFH. DCFH rapidamente reage com o H₂O₂ na presença de peroxidase, citocromo c ou Fe⁺⁺, dando origem ao produto fluorescente DCF. Nos últimos anos, este método tem sido amplamente utilizado para medir a formação do H₂O₂ em diferentes tipos de tecidos, incluindo neutrófilos, células endoteliais, células do sistema nervoso central e células

musculares (Bass et. al., 1983; Szejda et. al., 1984; Burow & Valet, 1987; Reid et. al., 1992; Royall & Ischiropoulos, 1993). Apesar da sua alta afinidade pelo H_2O_2 , outras EROs também podem oxidar o DCFH (Zhu et. al., 1994; Reyk et. al., 2001).

1.3 - DETERMINAÇÃO *IN VIVO* DA PRODUÇÃO DE H_2O_2 EM COMBINAÇÃO COM A TÉCNICA DE MICRODIÁLISE EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATO SUBMETIDO A CONTRAÇÕES.

Atualmente ainda é muito comum em análises clínicas e em pesquisas básicas na área biológica examinar as alterações metabólicas intracelulares pela determinação das alterações plasmáticas de um determinado composto. Porém, esses métodos de determinação plasmática podem não proporcionar informações precisas sobre as alterações intracelulares tornando as medidas sanguíneas irrelevantes. A principal razão para essa discrepância está nas diferentes características cinéticas apresentadas pelos diferentes compostos nos diferentes compartimentos corporais, como o meio intracelular, meio intersticial e o sangue. Então, as medidas realizadas em amostras de sangue podem ser completamente diferentes daquelas realizadas no meio intersticial, onde as alterações de um determinado composto é esperada para refletir com maior confiança as alterações intracelulares (Lonroth, 1991). Como uma possível solução para este sério problema metodológico, novas técnicas invasivas foram desenvolvidas incluindo a técnica de microdiálise. Originalmente utilizada em 1972, a técnica de microdiálise tem sido considerada como um atrativo instrumento para o estudo das alterações metabólicas *in situ*, uma vez que ela permite o contínuo monitoramento e manipulação do líquido intersticial (Lonroth & Smith, 1990). Seu princípio básico consiste na difusão de um determinado composto por uma membrana semi-permeável inserida em um tecido específico. O contínuo fluxo de substância do interior da membrana de microdiálise para o meio intersticial e vice-versa permite a determinação da concentração de um determinado composto intracelular no líquido dialisado. Outra vantagem desse método consiste na sua capacidade de perfundir um determinado tecido com um agente farmacológico em concentrações relativamente altas, produzindo um grande efeito local sem grandes alterações sistêmicas (Arner & Bolinder, 1991; Ungerstedt, 1991).

Este método, portanto, tem sido amplamente utilizado nos dias atuais no estudo de diferentes compostos intersticiais em diferentes tecidos, incluindo o músculo esquelético (Speciale et. al., 1988; Amberg & Lindefors, 1989; Hamberger, 1989; Simonsen et. al., 1994; Maggs et. al., 1995).

1.4 - FORMAÇÃO EXTRACELULAR DO RADICAL SUPERÓXIDO EM CULTURA DE CÉLULAS MUSCULARES E MÚSCULO ESQUELÉTICO ISOLADO DURANTE CONTRAÇÕES.

Atualmente o radical ânion superóxido tem sido considerado uma das mais importantes espécies reativas de oxigênio (EROs) produzida em nosso organismo, especialmente por ser o primeiro intermediário na redução univalente do O_2 no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, dando origem a muitas outras espécies reativas, incluindo principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Yu, 1994; Halliwell, 1996). Portanto, a regulação dos níveis de $O_2^{\cdot -}$ tem sido considerada fundamental para o estabelecimento do balanço redox na maioria dos tecidos em nosso organismo, incluindo o tecido muscular esquelético, um importante sítio de produção de EROs durante o estado basal de repouso e durante o exercício, onde o consumo de O_2 é muitas vezes aumentado (Davis et. al., 1976; Meydani & Evans, 1993; Bangsbo, 2000). Estudos recentes tem mostrado evidências de que o exercício físico pode aumentar a formação de EROs ao ponto de superar a capacidade do sistema de defesa antioxidante (Davies et. al. 1982; Jackson et. al., 1985; Clanton et. al., 1999). Nessas condições, o balanço redox das células do tecido é alterado para um estado mais oxidado, causando lesão e comprometimento das funções biológicas de diferentes tecidos, incluindo o tecido muscular esquelético (Andrade et. al., 1998; Clanton et. al., 1999).

Lynch & Fridovich em 1978, foram os primeiros a mostrar que o radical $O_2^{\cdot -}$ produzido nas hemácias pode ser liberado do meio intra para o meio extracelular via canais iônicos de membrana. Em músculo esquelético isolado, Reid et. al. (1993) em um elegante estudo, confirmaram os achados de Lynch & Fridovich (1978). Porém, no modelo experimental de Reid e co-autores (1992), o tecido vascular, um importante sítio de formação do $O_2^{\cdot -}$ não pode ser completamente removido, tornando questionável a

interpretação dos resultados, assim como a fonte geradora do $O_2^{\cdot-}$. Em adição, na preparação de músculo isolado, a presença de algumas células sanguíneas, as quais são conhecidas fontes de produção de EROs, como hemácias e neutrófilos pode ocorrer, interferindo nos resultados finais. Além do modelo experimental, outra importante variável que pode influenciar na liberação extracelular do $O_2^{\cdot-}$ é o perfil bioquímico do músculo envolvido. Evidências sugerem que tecidos com alto potencial oxidativo exibem uma maior capacidade oxidativa, bem como uma maior atividade antioxidante comparados àqueles de menor potencial oxidativo. Então, podemos especular que a produção final do $O_2^{\cdot-}$ e a adaptação do sistema de defesa antioxidante devam muito provavelmente, ser músculo dependente. Isso significa que a produção final do $O_2^{\cdot-}$ ou de outra espécie de oxigênio dependerá sempre do balanço oxidante/antioxidante intramuscular. Embora a formação intracelular de $O_2^{\cdot-}$ tenha sido bastante explorada, pouco se conhece a respeito da sua liberação extracelular (Carter et. al., 1994; Budd et. al., 1997; Al-Mehdi et. al., 1997; Satoh et. al., 1998; Zuo et. al., 2000). Então, apesar da determinação absoluta da produção de EROs ser ainda uma tarefa complicada, a detecção extracelular do $O_2^{\cdot-}$ pode ser vantajosa na aplicação *in vivo*. Nos últimos anos o fluido intersticial tem sido alvo de importantes investigações nas alterações de diferentes compostos metabólicos produzidos no meio intracelular em estudos *in vivo*. As análises neste compartimento viabilizam a determinação das alterações de compostos muito instáveis. Devido a esta instabilidade estes compostos dificilmente poderiam alcançar o sangue, um compartimento ainda bastante usado nas investigações de muitos compostos metabólicos de baixa estabilidade. Atualmente, diversos métodos para detecção de EROs estão disponíveis na literatura, entre eles podemos destacar os métodos de espectrofotometria, quimioluminescência, ressonância paramagnética de elétrons (EPR) e fluorescência. Todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens, porém, o método de fluorescência ainda tem sido o mais indicado, pois além da alta sensibilidade, este método pode facilmente ser aplicado em modelos *in vivo*, onde espera-se uma formação de EROs muito baixa, exigindo o emprego de um método de detecção que apresente alguma sensibilidade (Jenkins, 2000).

2 - OBJETIVOS:

Nosso objetivo principal no presente estudo foi de estabelecer métodos capazes de determinar a formação de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e NO com alta sensibilidade e seletividade em culturas de células musculares, em músculo esquelético isolado e *in vivo*. Para realização deste estudo nosso objetivo principal foi dividido em 3 etapas:

1 – Determinação da formação intra e da liberação extracelular de NO e H_2O_2 em culturas de células musculares utilizando sondas fluorescentes durante contrações induzidas por estímulo elétrico.

2 - Determinação da formação extracelular do $O_2^{\cdot-}$ em culturas de células musculares e músculo esquelético isolado utilizando sonda fluorescente durante contrações induzidas por estímulo elétrico.

3 – Determinação da formação de H_2O_2 *in vivo* utilizando sonda fluorescente em combinação com a técnica de microdiálise durante contrações induzidas por estímulo elétrico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

3.1 - ISOLAMENTO E CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DE RATO.

Todos procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas da Convenção Européia de Proteção de Animais Vertebrados Usados para Propostas Científicas e Experimentais (Council of Europe NO123, Strasbourg, France, 1985). Ratos Wistar machos pesando entre 150 – 200 g foram sacrificados com CO₂ injetado dentro de um recipiente lacrado e com capacidade de 5L de volume. Este procedimento induz a morte do animal em menos de 3 min. Rapidamente os músculos sóleo, gastrocnêmio e quadríceps femoral foram isolados em DPBS contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v). Durante 10 min o tecido muscular foi triturado e a suspensão digerida com colagenase II 1,5 % (w/v), tripsina 2,5 % (w/v) e DNase 0,1% (w/v) em DMEM contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (v/v) a 37° C por 30 min. DMEM (15 mL) contendo soro de cavalo 10 % (v/v), soro de feto bovino 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM e penicilina 1% (v/v) foi adicionado (meio de crescimento). A suspensão foi centrifugada a 300 g, a 4° C por 8 min e o sobrenadante descartado. 20 mL do meio de crescimento foram novamente adicionados, a suspensão foi filtrada através de um filtro esterelizado com poros de 50 µm e as células foram sedimentadas em prato de 90 mm de diâmetro por 30 min a 37° C. Durante este intervalo, os fibroblastos se fixam ao fundo do prato enquanto os mioblastos permanecem em suspensão. O meio livre de fibroblastos foi removido e as células foram contadas e sedimentadas em pratos de 13 mm cobertos com matrigel 0,1 % (w/v) por 24 h a uma densidade de 6×10^4 células por prato. Entre 48-72 h após o início da preparação das culturas, o meio de crescimento foi alterado para meio de fusão contendo soro de cavalo 10 % (v/v) e L-glutamina 2 mM (Lyngé et. al., 2001). Todos os experimentos foram realizados entre o 5° e 10° dia após a preparação final das culturas de células.

A figura 3 mostra o esquema de isolamento de células musculares e a preparação da cultura.

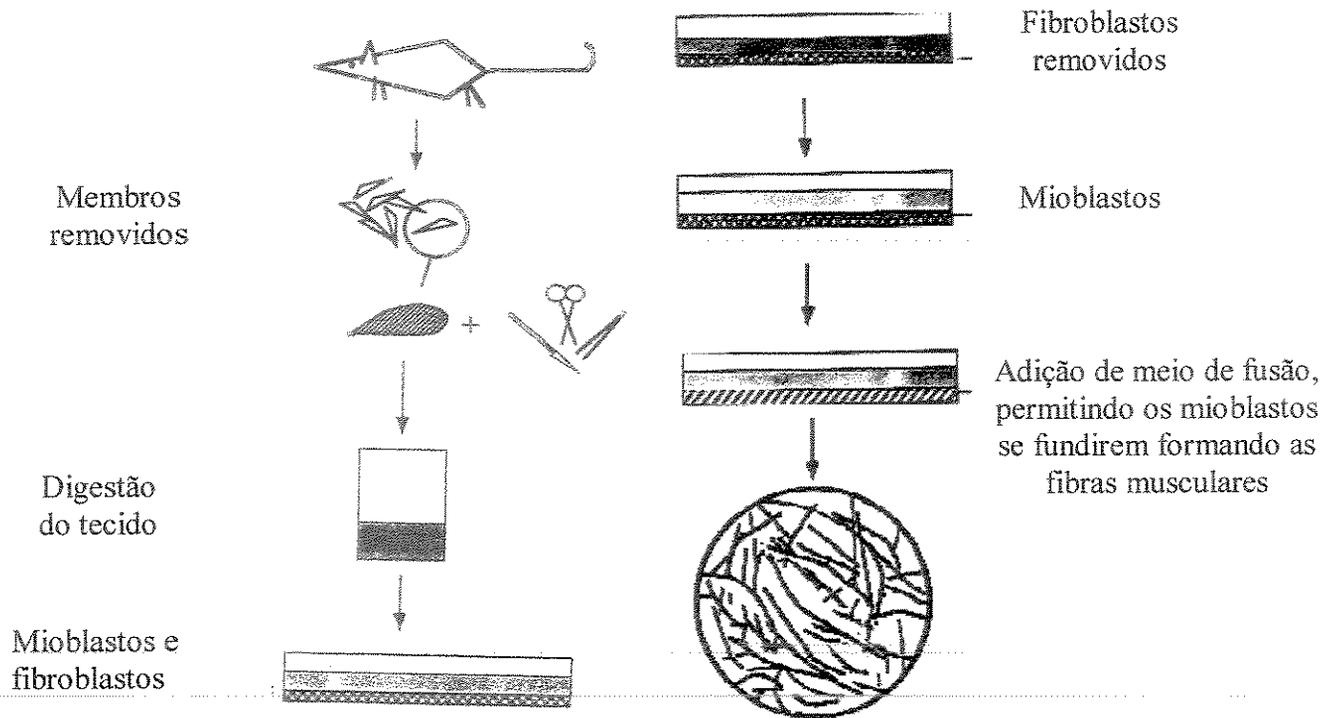


Figura 3: Isolamento e cultura primária de células musculares esqueléticas de rato.

3.2 - CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES:

A figura 4 mostra o desenvolvimento das culturas de células musculares e o processo de fusão com a formação de fibras seguido através de micrografias eletrônicas.

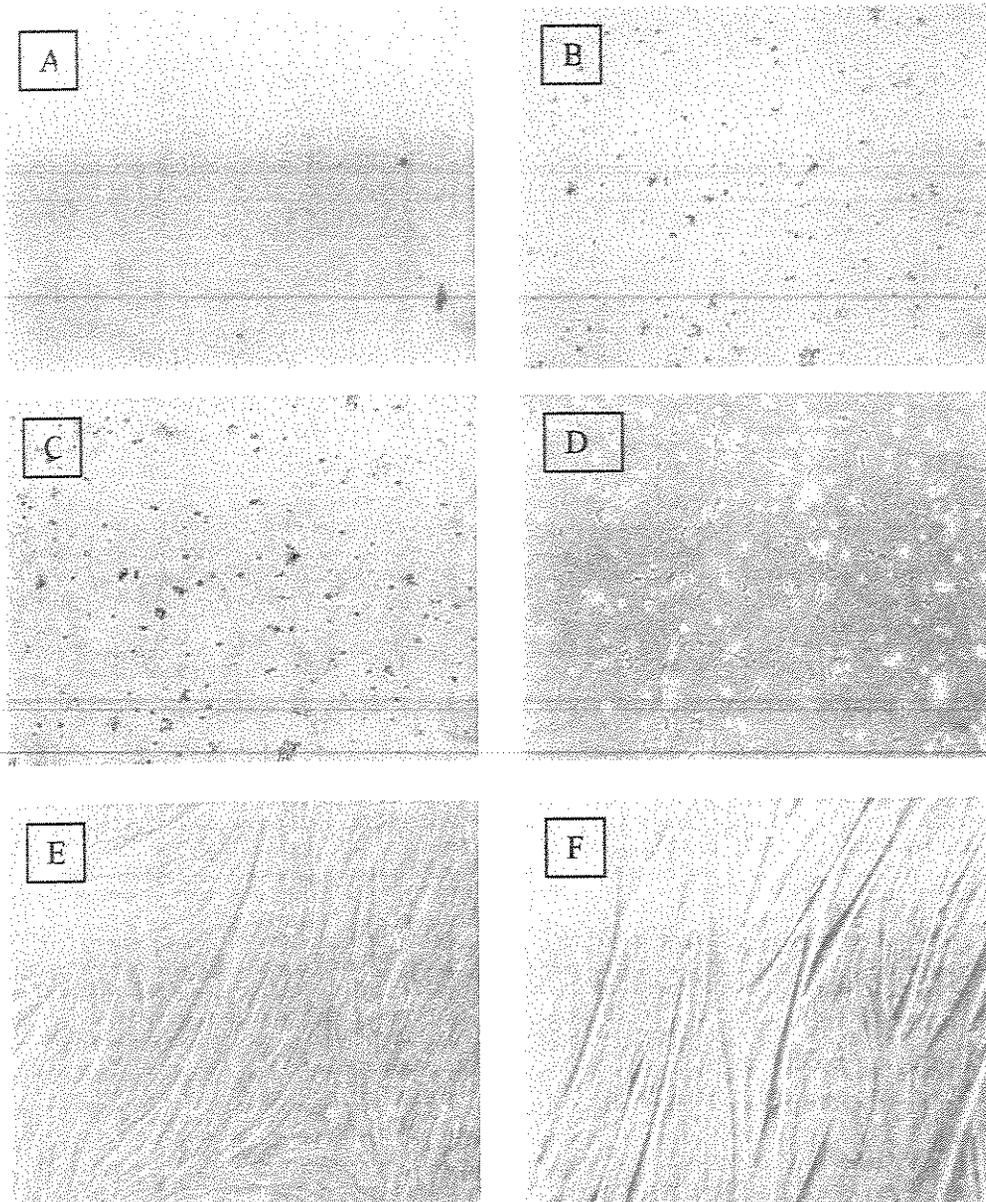


Figura 4: As micrografias ilustram as diferentes fases de crescimento das culturas primárias de células musculares. A: Isolamento dos mioblastos em meio de crescimento (1° dia). B e C: Desenvolvimento dos mioblastos em meio de crescimento (2° e 3° dia, respectivamente). D: Início da fusão dos mioblastos em meio de crescimento (4° dia). E: Fusão dos mioblastos em meio de fusão (5° dia). F: Estágio final de formação dos miócitos maduros (6° dia).

3.3 - ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DAS CULTURAS DE CÉLULAS MUSCULARES:

As células no seu estágio maduro foram estimuladas através de um par de eletrodo de prata em pratos de cultura medindo 13 mm de diâmetro. Dois protocolos de estimulação elétrica previamente descritos por Hellsten & Frandsen (1997) foram utilizados e comparados à contração espontânea das células em repouso (grupo controle).

Protocolo de intensidade moderada: O protocolo consistiu de sessões (“trains”) de estímulos com duração de 0,5 s e com intervalos de 0,5 s de pausa. Dentro das sessões os estímulos foram de 1 ms de duração (“width”) e com 0,1 s de intervalo de pausa entre os estímulos a uma tensão de 50 V.

Protocolo de intensidade alta: O protocolo consistiu de sessões de estímulos com duração de 0,7 s e com intervalos de 0,3 s de pausa. Dentro das sessões os estímulos foram de 1 ms de duração e com 0,01 s de intervalo de pausa entre os estímulos a uma tensão de 50 V.

3.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CREATINA QUIINASE (CK):

A atividade da enzima CK foi determinada por espectrofotometria a 340 nm através do kit reagente CK (Sigma). Em resumo, 20 µL do sobrenadante foram adicionados a 1 mL do reagente CK e incubados a 37° C durante 3 min. A absorbância foi monitorada a cada 30 s durante 120 s e a atividade da enzima foi determinada conforme descrito no manual de procedimentos do kit reagente CK.

3.5 - DOSAGEM DE PROTEÍNA:

O conteúdo de proteína das culturas de células foi determinado por espectrofotometria através do kit BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Em resumo, 25 μL do sobrenadante foram adicionados a 500 μL do reagente BCA e mantidos por 2 h a temperatura ambiente. A absorbância foi monitorada a 550 nm e as concentrações de proteína das amostras foram determinadas através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de proteína.

3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados estão apresentados como média \pm EP e os testes ANOVA (1 via) paramétrico seguido de Sheffé e teste t' Student para amostras independentes foram usados para as análises dos resultados. O nível de significância estabelecido foi de $P < 0,05$. O software utilizado foi "STATISTICS FOR WINDOWS", 4.3 (Statsoft, Inc. 1993). Em alguns casos isolados os resultados foram expressos como média \pm DP.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS ESPECÍFICOS:

4.1 – DETERMINAÇÃO DE NO *IN VITRO*:

Reagentes: 4,5-Diaminofluoresceína (DAF-2) e 4,5-Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2-DA) foram obtidos da Molecular Probes, Europe BV. Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro de cavalo e soro bovino foram obtidos da Gibco. Colagenase II, tripsina e penicilina foram adquiridos da Boehringer Mannheim. DNase, Tampão fosfato-salina de Dulbecco (DPBS), N^G-nitro-L-arginine (L-NA), hemoglobina (Hb), nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitrosotiol doador de NO (SNAP), tiron, arginina e bradicinina foram adquiridos da Sigma (Dinamarca). As soluções utilizadas foram sempre preparadas diariamente, momentos antes do início dos experimentos.

Curva padrão: Os experimentos *in vitro* na ausência de células foram realizados para testar o uso da sonda fluorescente DAF-2 como um detector do NO. As reações foram realizadas em sulfato de cobre (0,1 M) e pH 7,4. O volume final foi de 1 mL e a reação foi iniciada pela adição de concentrações crescentes de SNAP como doador de NO (0, 300, 600, 900, 1200 e 6000 nM) e DAF-2 (10 µM). A intensidade de fluorescência medida em espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F2000) emitida pelo DAF-2 foi monitorada durante 1000 s. As análises foram realizadas nos seguintes comprimentos de onda: emissão 515 nm e excitação 490 nm. Durante todo experimento o meio de reação na cubeta foi agitado e a temperatura mantida em 37° C.

4.1.2 - CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS:

Tecido adiposo localizado no peritoneo de ratas grávidas de 21 dias foi isolado e dissecado. As células do tecido microvascular endotelial foram purificadas como descrito por Wagner & Matthews (1975). O tecido adiposo foi digerido com 0,2% de colagenase a 37° C por 20 min. DMEM contendo 20% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e penicilina 1/1 (v/v) foram adicionados e a suspensão centrifugada a 300 g, 4° C por 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células suspensas em 10 mL de DMEM e filtradas através de um filtro esterilizado com poros de 50 µm. As células foram centrifugadas e

novamente resuspendidas em meio de crescimento DMEM contendo soro de cavalo 10 % (v/v), soro fetal bovino 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 1% (v/v) e 30 U.mL⁻¹ de heparina. As células foram então identificadas com o Dil-Ac-LDL (“1,1'-dioctodecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina perclorato – lipoproteína de baixa densidade-acetilada) (Voyta et. al. 1984). Posteriormente, as células endoteliais foram colocadas em pratos de 13 mm contendo meio de crescimento DMEM numa razão de 1:3. Todos os experimentos foram realizados entre o 5° e 8° dia após a preparação final das células.

4.1.3 - ESTIMULAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO EXTRACELULAR DO NO EM CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS:

Por serem um bem estabelecido sítio de produção de NO (Palmer et. al., 1987; Palmer et. al., 1988), culturas de células endoteliais foram utilizadas como experimento controle. As células foram lavadas e mantidas a 37° C em 200 µL de solução Krebs Ringer, contendo DAF-2 (10 µM) e estimuladas quimicamente com bradicinina (1µM) durante 10 min. Imediatamente após, amostras de 50 µL foram coletadas e a intensidade de fluorescência do DAF-2 foi medida conforme descrito anteriormente. Para verificar a especificidade do método, L-NA (300 µM) foi utilizada como inibidor da enzima NOS (Gunasekar et. al., 1995; Lopez-Figueroa et. al., 2000). Os resultados foram comparados com o experimento controle sem bradicinina. Todos os experimentos foram realizados em ambiente protegido de luz para evitar a oxidação do DAF-2.

4.1.4 – DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DO NO EM CULTURA DE CÉLULAS MUSCULARES:

As células em seus estágios maduros, 6×10^4 por prato, foram lavadas com solução de Krebs Ringer e mantidas a 37°C em $200 \mu\text{L}$ de solução Krebs Ringer contendo em mM: NaCl 118,5, NaHCO_3 24,7, KCl 4,7, MgSO_4 1,18, KH_2PO_4 1,18, CaCl_2 2,5 e equilibrada com 95% O_2 - 5% CO_2 . Heps 25 mM e glicose 5 mM foram adicionados e o pH ajustado em 7,4. Em seguida, as células foram carregadas com DAF-2-DA ($10 \mu\text{M}$) por 20 min. Após 20 min, foram lavadas novamente como descrito acima e adicionados $200 \mu\text{L}$ da solução de Krebs Ringer. O estímulo elétrico de alta e moderada intensidade foi aplicado durante 20 min e imediatamente após, o meio extracelular foi removido e $60 \mu\text{L}$ de H_2O adicionados as culturas. As células foram raspadas, a suspensão rapidamente centrifugada a 12.000 g por 15 s e amostras de $50 \mu\text{L}$ do sobrenadante imediatamente coletadas. A intensidade de fluorescência do DAF-2 foi medida nos seguintes comprimentos de onda: emissão a 515 nm e excitação a 490 nm. Para verificar a especificidade do método L-NA ($300 \mu\text{M}$) foi adicionado. Em experimentos independentes, Tiron (1 mM), um antioxidante intracelular do O_2^- e Arginina ($500 \mu\text{M}$) como substrato da NOS foram utilizados. Durante todo experimento o meio de reação na cubeta foi agitado e a temperatura mantida em 37°C . Todos os experimentos foram realizados em ambiente protegido de luz para evitar a rápida oxidação do DAF-2.

4.1.5 – DETERMINAÇÃO EXTRACELULAR DO NO EM CULTURA DE CÉLULAS MUSCULARES:

As células em seus estágios maduros, 6×10^4 por prato, foram lavadas e mantidas a 37°C em $200 \mu\text{L}$ de solução Krebs Ringer conforme descrito anteriormente para as análises de NO no meio intracelular. Em seguida, as células foram carregadas com DAF-2 ($10 \mu\text{M}$) e estimuladas eletricamente pelos protocolos de alta e moderada intensidade durante 20 min. Amostras de $50 \mu\text{L}$ foram imediatamente coletadas no meio extracelular e a intensidade de fluorescência do DAF-2 foi medida em um espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F2000) durante 60 s. Os comprimentos de onda foram estabelecidos em emissão a 515 nm e excitação a 490 nm . Para verificar a especificidade do método L-NA ($300 \mu\text{M}$) foi adicionado.

4.2 – DETERMINAÇÃO DO H_2O_2 *IN VITRO*:

Reagentes: 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) foi obtido da Molecular Probes, Europe BV (Holanda). Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro de cavalo e soro bovino foram obtidos da Gibco. Colagenase II, tripsina e penicilina foram adquiridos da Boehringer Mannheim (Alemanha). DNase, Tampão fosfato-salina de Dulbecco (DPBS), glutathione reduzida (GSH), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), dimetilsulfóxido (DMSO), D-fenilalanina (D-Fenil), hemoglobina (Hb) e arginina (arg), N^G -nitro-L-arginina (L-NA), tiron, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), nitroprussiato de sódio (SNP), xantina (XA) e xantina oxidase (XO) foram adquiridos da Sigma (Dinamarca). As soluções utilizadas foram sempre preparadas diariamente, momentos antes do início dos experimentos.

Solução estoque de DCFH: DCFH foi preparado através da hidrólise do grupo diacetato após algumas modificações do método de Cathcart et. al. (1983). Em resumo, 5 mg de DCFH-DA em 2 mL de metanol foram misturados a 2 mL de NaOH (0,05 N) em pH 7,0. A hidrólise ocorreu em temperatura ambiente, protegido da luz por 30 min. Em seguida, a mistura foi neutralizada com NaH_2PO_4 (50 mM) em pH 7,4. Esta solução final foi então dividida em alíquotas de $25 \mu\text{L}$, protegidas da luz e estocadas a -20°C .

4.2.1 - EXPERIMENTOS *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS:

Determinação do H₂O₂:

Curva padrão: Os experimentos *in vitro* foram realizados para testar o uso da sonda fluorescente DCFH como um detector do H₂O₂. As reações foram realizadas em tampão Tris-HCl (40 mM), pH 7,4. O volume final foi de 1 mL contendo citocromo c (10 µM) e DCFH (10 µM). A reação foi iniciada pela adição crescente de H₂O₂ (0, 10, 20, 30, 40, 50, e 100 µM). A oxidação do DCFH foi monitorada pela intensidade de fluorescência (Hitachi, modelo F2000) emitida pelo DCFH oxidado durante 300 s. As análises foram realizadas com emissão a 525 nm e excitação a 488 nm. Durante todo experimento o meio de reação na cubeta foi agitado e a temperatura mantida em 37° C.

4.2.2 - DETERMINAÇÃO EXTRACELULAR DO H₂O₂:

As células em seus estágios maduros, 6×10^4 por prato, foram lavadas e mantidas a 37° C em 200 µL de solução Krebs Ringer contendo em mM: NaCl 118,5, NaHCO₃ 24,7, KCl 4,7, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1,18, CaCl₂ 2,5 e equilibrada com 95% O₂ - 5% CO₂. Hepes 25 mM e glicose 5 mM foram adicionados e o pH ajustado em 7,4. Em seguida, DCFH (10 µM) foi adicionado e o estímulo elétrico foi aplicado conforme descrito anteriormente durante 20 min. Amostras de 50 µL foram imediatamente coletadas no meio extracelular e a intensidade de fluorescência do DCFH oxidado foi monitorada em um espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F2000) durante 60 s, com emissão a 525 nm e excitação a 488 nm. Para detecção extracelular do H₂O₂ GSH (0,5 mM)-GPX (5 U.mL⁻¹) e CAT (300 U.mL⁻¹) foram adicionados como sequestradores do H₂O₂. SOD (30 U.mL⁻¹) e D-fenilalanina (1 mM) foram usados como sequestradores do O₂^{•-} e [•]OH, respectivamente. L-NA (300 µM) foi utilizado como inibidor da enzima NOS. Todos os antioxidantes e inibidores foram adicionados imediatamente antes da estimulação elétrica e os experimentos realizados em ambiente protegido de luz para evitar a rápida oxidação do DCFH.

4.2.3 - DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DO H₂O₂:

As células em seus estágios maduros, 6×10^4 por prato, foram lavadas com solução Krebs Ringer e mantidas a 37° C em 200 µL solução Krebs Ringer como descrito no item anterior e carregadas com DCFH-DA (10 µM) por 20 min. Em seguida, foram lavadas 2 vezes e novamente adicionados 200 µL da solução de Krebs Ringer. O estímulo elétrico de alta intensidade foi aplicado durante 20 min e imediatamente após, o meio extracelular foi removido e 60 µL de H₂O foram adicionados às culturas. As células foram raspadas, a suspensão rapidamente centrifugada a 12.000 x g por 15 s e amostras de 50 µL imediatamente coletadas no sobrenadante. A intensidade de fluorescência do DCFH oxidado foi medida conforme descrito no item anterior. Para a detecção intracelular das EROs, GSH (0,5 mM), tiron (1 mM) e DMSO (10 mM) foram adicionados como sequestradores do H₂O₂, O₂^{•-} e [•]OH respectivamente. L-NA (300 µM) foi utilizado como inibidor da enzima NOS. Todos os sequestradores e inibidores foram adicionados 20 min antes da estimulação elétrica e os experimentos realizados em ambiente protegido de luz para evitar a rápida oxidação do DCFH.

4.3 – DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ *IN VIVO*:

Reagentes: 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) foi comprado da Molecular Probes, Europe BV. Fc OxyBURT consiste da molécula de DCFH (PM 487,29) ligada covalentemente à molécula de albumina de soro bovino (BSA, PM ~74.000) e foi adquirido da empresa Molecular Probes, Europe BV (Holanda). Todos os demais reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical (Dinamarca). As soluções utilizadas foram sempre preparadas diariamente momentos antes do início dos experimentos.

4.3.1 - EFEITO ANTIOXIDANTE DA CAT E GSH-PX NA OXIDAÇÃO DO DCFH *IN VITRO*:

As reações foram realizadas em tampão Tris-HCl (40 mM) e pH 7,4. O volume final na cubeta foi de 1 mL contendo citocromo c (10 μ M) e DCFH (10 μ M). A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (0, 10, 10³ e 10⁵ nM). A inibição da reação foi feita pela adição de CAT (300 U.mL⁻¹) e GSH (0,5 mM)-PX (5 U.mL⁻¹). A oxidação do DCFH foi monitorada conforme descrito no item 4.2.2.

4.3.2 - EXPERIMENTOS *IN VITRO* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICRODIÁLISE:

4.3.2.1 - MEMBRANA DE MICRODIÁLISE:

O modelo da membrana de microdiálise (GFE18, CMA Microdialysis, Suécia) foi descrita anteriormente em maiores detalhes (MacLean et. al., 1999). Em resumo, a membrana feita de policarbonato possui poros com diâmetros moleculares de 5000 Da e um diâmetro externo (DE) e interno (DI) de aproximadamente 0,22 e 0,20 mm, respectivamente. As extremidades da membrana foram conectadas a duas peças de tubo de nylon (DE 0,63 mm e DI 0,50 mm) e coladas de forma que o verdadeiro comprimento da membrana para os experimentos *in vitro* fosse de 30 mm e para os experimentos *in vivo* de aproximadamente 8 – 10 mm. Em adição, uma linha de sutura (Ethicon) foi colada em paralelo à membrana garantindo-lhe uma maior resistência. O princípio de funcionamento dessa técnica utilizando membrana de microdiálise consiste na entrada da solução de perfusão por uma das extremidades tubulares da membrana seguido do monitoramento de sua saída pela extremidade oposta. A superfície porosa da membrana permite o contato permanente entre a solução de perfusão e o líquido do tampão, ou no caso dos experimentos *in vivo*, o meio extracelular. Portanto, as alterações de diferentes compostos metabólicos no meio extracelular podem facilmente ser monitorados se um marcador específico é utilizado na solução de perfusão.

4.3.2.2 – CURVA PADRÃO:

Os experimentos *in vitro* e livres de tecido muscular foram realizados para testar o uso da sonda fluorescente DCFH como detector do H_2O_2 em combinação com a técnica de microdialise (figura 5). A membrana de microdialise foi colocada dentro de um becker contendo Tris-HCl (40 mM), pH 7,4. Uma de suas extremidades foi conectada a uma bomba de microdialise (modelo, sp101i Syringe Pump) e o becker colocado sobre um agitador magnético com a temperatura do meio de reação mantida em 37° C por todo experimento. A solução de perfusão contendo Tris-HCl (40 mM), citocromo c (10 μ M) e DCFH-BSA (10 μ M) foi injetada através da membrana pela bomba de microdialise a um fluxo de 2.5 μ L.min⁻¹. Posteriormente, concentrações crescentes de H_2O_2 (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 100 μ M) foram adicionadas ao meio de reação contido no becker. Como inibidores da reação entre H_2O_2 e DCFH foram utilizados GSH (0,5 mM) e GPX (5 U.mL⁻¹). Amostras do dialisado (25 μ L) foram coletadas, pesadas e imediatamente analisadas em um espectrofluorímetro (Hitachi, modelo F2000) com emissão a 520 nm e excitação a 490 nm. A precisão da bomba de microdialise foi sempre verificada pelas análises dos valores de peso do líquido dialisado.

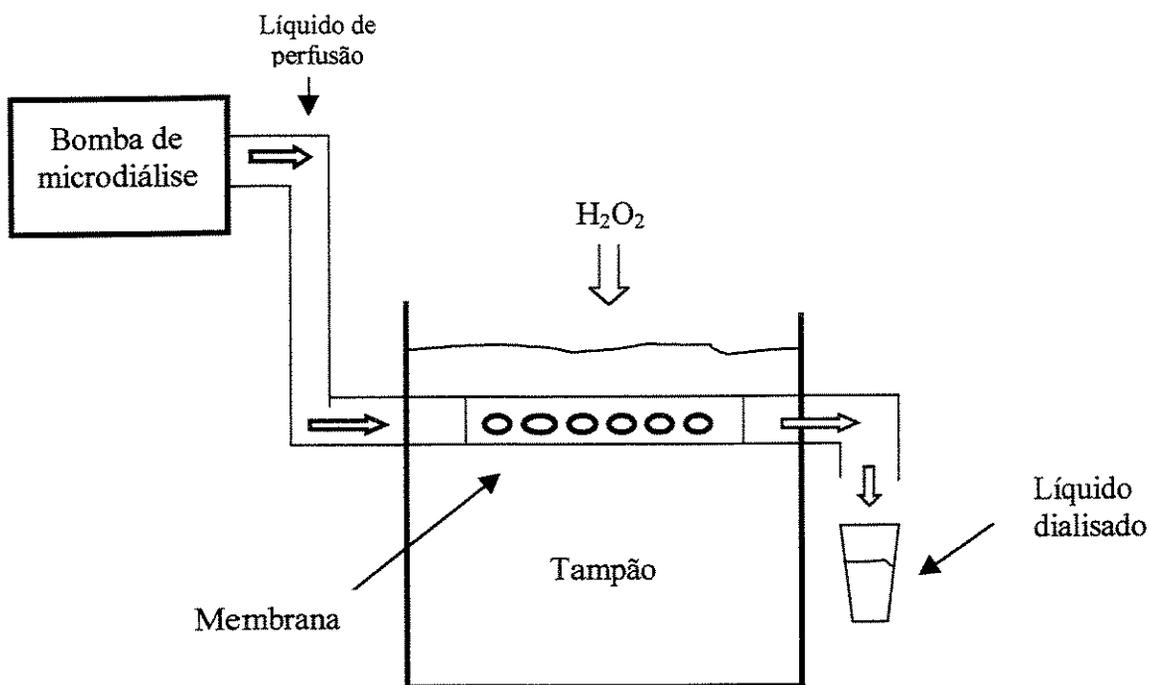


Figura 5: Modelo dos experimentos com microdialise *in vitro*.

4.3.3 - EXPERIMENTOS *IN VIVO*:

Animais: Ratos Wistar machos, pesando entre 250-300 g foram mantidos a uma temperatura de 22° C em um ciclo 12-h claro/12-h escuro (07:00 – 19:00 h), sem restrição de água e comida.

Procedimento Experimental: Todos procedimentos experimentais foram realizados de acordo com Convenção Européia de Proteção de Animais Vertebrados Usado para Propostas Científicas e Experimentais (Council of Europe NO123, Strasbourg, France, 1985). Os animais foram inicialmente anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital de sódio (50 mg.kg de peso corporal⁻¹). A anestesia foi mantida com doses extras do anestésico (5 mg.kg de peso corporal⁻¹) a cada 30 min. A temperatura durante todo experimento foi mantida a 37° C por meio de uma lâmpada incandescente. A pele de uma das pernas do animal foi removida por completo e uma agulha (Venflon, iv, Dinamarca) foi cuidadosamente inserida no músculo gastrocnêmio medial no sentido paralelo às fibras musculares. A distância final entre o sítio de entrada e saída da agulha foi de aproximadamente 20 mm. Como determinado pela dissecação do músculo gastrocnêmio após os experimentos a membrana de microdiálise foi inserida a cerca de 2 a 3 mm abaixo da fáscia do músculo gastrocnêmio. Em seguida, o animal foi colocado em uma plataforma de perfusão, sua perna imobilizada por meio de um pino inserido sob o tendão patelar e então fixado à plataforma de perfusão. De modo semelhante a extremidade distal também foi fixada e o tendão de Aquiles foi conectado a um transdutor isométrico de força (modelo 220, Clevite Brush Mark). Finalmente, após a imobilização da perna do animal, a membrana de microdiálise foi inserida no músculo gastrocnêmio através da agulha de microdiálise, sendo esta cuidadosamente retirada. Após a inserção, a membrana foi conectada a uma bomba de perfusão (modelo, sp101i Syringe Pump) e o músculo perfundido a um fluxo de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 45 min com Krebs Ringer contendo em mM: NaCl 118,5, NaHCO₃ 24,7, KCl 4,7, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1,18, CaCl₂ 2,5. Após ser equilibrada com 95% O₂ - 5% CO₂, Hepes 25 mM e glicose 5 mM foram adicionados, o pH ajustado em 7,4 e a solução final mantida a 37° C por 15 min. Após os 45 min iniciais, foram adicionados à solução de perfusão citocromo c (10 μM) e DCFH-BSA (10 μM) e o fluxo foi diminuído para 0.1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Em seguida, após a confirmação da estabilização do

sinal de linha de base durante 300 s, o protocolo de estimulação elétrica foi iniciado como descrito no item seguinte e exemplificado na figura 21. Em experimentos independentes, os antioxidantes CAT (300 U.mL^{-1}) e GSH ($0,5 \text{ mM}$)-PX (5 U.mL^{-1}) foram adicionados à solução de perfusão como inibidores específicos da reação entre o H_2O_2 formado pelas células musculares do animal sob estímulo elétrico e o DCFH-BSA contido no líquido de perfusão.

4.3.4 - ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:

Após um pequeno corte cirúrgico próximo à região do quadril, um eletrodo de prata foi cuidadosamente preso ao nervo esquiático do animal e conectado a um estimulador elétrico (Disa Impulse Generator, Dinamarca). Antes do início do protocolo de estimulação elétrica ou durante os primeiros 30 s de contrações, o comprimento ideal de repouso (L_0) dos músculos da perna do animal envolvidos na contração e a tensão ideal (V_0) foram ajustados de modo a obter-se o máximo de força durante a estimulação elétrica. O protocolo de estimulação elétrica final foi realizado conforme descrito anteriormente por Wojtaszewski et. al. (1996).

- Estimulação intensa: sessões de 200 ms foram aplicados a cada 1 s durante 900 s, a frequência de impulsos foi de 100 Hz, a duração dentro das sessões de 0,1 ms e a voltagem de $30 \pm 2 \text{ V}$.

4.3.5 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE FORÇA:

Os valores de tensão desenvolvidos pelos músculos durante a estimulação elétrica foram gravados por um registrador automático em papel milimetrado. Pesos com massas conhecidas de 2, 20, 50, 200 e 500 g foram utilizados para a construção de uma curva padrão. Os valores de massa foram plotados versus os valores da distância percorrida pela caneta do registrador automático e os níveis de força muscular média e máxima foram determinados pela equação $y = ax + b$, onde os parâmetros “a” e “b” foram obtidos pelo ajuste dos mínimos quadrados das medidas experimentais.

4.4 - DETERMINAÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot -}$ *IN VITRO*:

Reagentes: 5-(2-carboxifenil)-5-hidroxi-1-((2,2,5,5-tetrametil-1-oxipirrolidina-3-yl)-metil)-3-fenil-2-pirrolin-4-one, proxil fluorescamina (Fluoróforo-nitróxido) foi obtido da Molecular Probes, Europe BV (Holanda). Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem Ca^{++} , Mg^{++} e fenol (Gibco), soro de cavalo e soro bovino foram obtidos da Gibco. Colagenase II, tripsina e penicilina foram adquiridos da Boehringer Mannheim (Alemanha). DNase, Tampão fosfato-salina de Dulbecco (DPBS), superóxido dismutase (SOD), xantina (XA), xantina oxidase (XO), dimetil sulfóxido (DMSO), ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), forbol 12-miriestato 13-acetato (PMA), cisteína e sulfato de ferro ($FeSO_4$) foram adquiridos da Sigma (Dinamarca). As soluções utilizadas foram sempre preparadas diariamente, momentos antes do início dos experimentos.

4.4.1 - EXPERIMENTOS *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS:

4.4.1.2 - Formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$): O $O_2^{\cdot -}$ foi gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase (XA/XO). O ensaio foi realizado em cubeta de 1 cm acoplada a um agitador magnético contendo 1,5 mL de solução tampão KH_2PO_4 (0,05 M), EDTA 10^{-4} , pH 7,4 e xantina (400 μM). A reação foi iniciada pela adição de XO em diferentes quantidades (0,0001; 0,001; 0,0025; 0,005 e 0,01 $U \cdot mL^{-1}$).

4.4.1.3 - Detecção do $O_2^{\cdot -}$: Para detecção do radical $O_2^{\cdot -}$ foram adicionados na mistura de reação cisteína (200 μM), nitróxido (50 μM) e DTPA (0,1 mM). A redução do nitróxido para sua correspondente hidroxilamina na presença de cisteína foi monitorada pela intensidade de emissão de fluorescência durante 15 min, como exibido no ítem resultados. Para os experimentos de fluorescência, as análises foram realizadas nos seguintes comprimentos de onda: emissão 485 nm e excitação 380 nm (Hitachi, modelo F2000). Durante todo experimento o meio de reação na cubeta foi agitado e a temperatura mantida em 37° C. Os experimentos foram realizados em ambiente protegido de luz para evitar a rápida oxidação do nitróxido.

4.4.2 - ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS:

Para verificar a eficiência do nitróxido na detecção extracelular do $O_2^{\cdot-}$, amostras contendo neutrófilos, um conhecido tipo de célula capaz de liberar o radical $O_2^{\cdot-}$ para o meio extracelular, foram utilizadas em um experimento controle. O isolamento de neutrófilos foi realizado segundo algumas modificações dos métodos de Boym (1964) e Boym (1966). Sangue total de humanos contendo EDTA como anticoagulante (200 mM) foi adicionado cuidadosamente sobre 3,5 mL de meio de separação PMN em tubo de centrifuga de 10 – 12 mL. A amostra foi centrifugada a 450 – 500 g por 30 min em temperatura mantida entre 18 - 22° C. Após a centrifugação, 2 camadas foram visíveis. A camada superior constituiu-se de células mononucleares e a inferior de neutrófilos polimorfonucleares (PMNN) (figura 6). Em seguida, a camada inferior foi cuidadosamente aspirada através de uma pipeta Pasteur. As células PMNN foram transferidas para um tubo de 10 mL, completando-se o volume com solução salina 0,9%. A amostra foi centrifugada a 400 g por 10 min em temperatura de 18 – 22° C. Neutrófilos (4×10^6 . mL⁻¹) foram resuspendidos em tampão HBSS equilibrado com 95% O₂ – 5% CO₂, pH 7,4 e DPTA 0,1 mM.

4.4.2.1 - Detecção do superóxido em neutrófilos:

1,5 mL do meio contendo neutrófilos foram adicionados a uma cubeta de 1 cm contendo nitróxido (50 μM) e PMA (100 ng.mL⁻¹ em DMSO 0,1 mM). Em experimentos independentes, cisteína (200 μM), SOD (30 U.mL⁻¹) e CAT (300 U.mL⁻¹) foram adicionados. A redução do nitróxido para sua correspondente hidroxilamina nos diferentes experimentos foi monitorada pela intensidade de emissão de fluorescência durante 800 s. Para os experimentos de fluorescência, as análises foram realizadas nos seguintes comprimentos de onda: emissão 485 nm e excitação 380 nm (Hitachi, modelo F2000). Durante todo experimento, o meio de reação na cubeta foi agitado e a temperatura mantida em 37° C. Os experimentos foram realizados em ambiente protegido de luz para evitar a rápida oxidação do nitróxido.

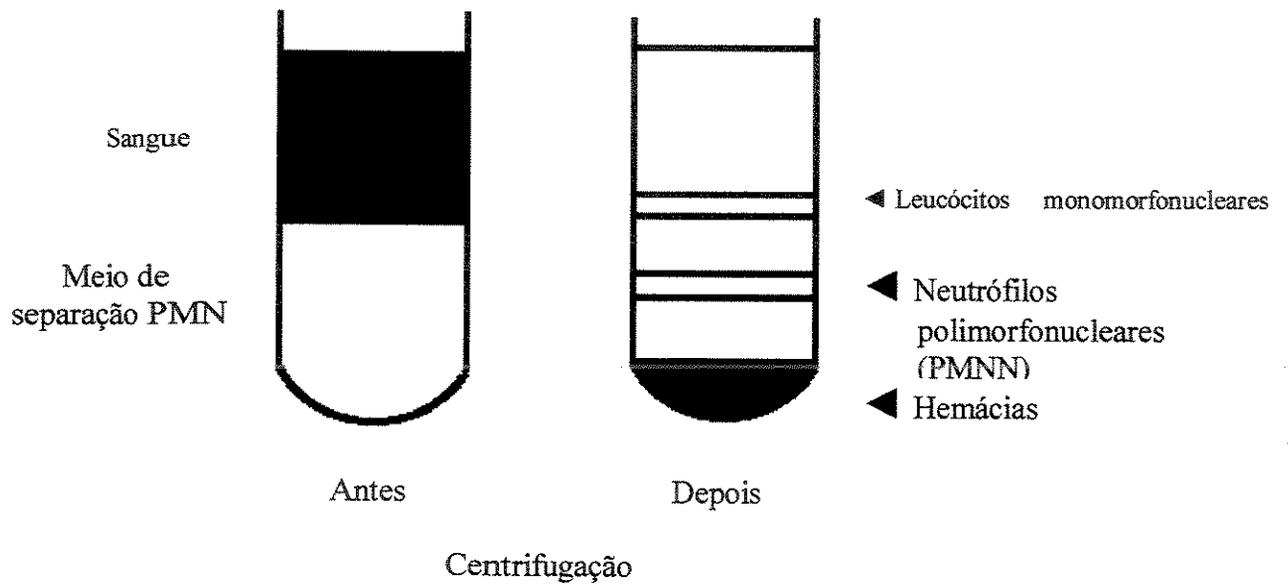


Figura 6: Isolamento de neutrófilos humanos (PMNN).

4.4.3 - EXPERIMENTOS COM MÚSCULOS ISOLADOS:

Animais: Ratos Wistar machos, pesando entre 100-150 g foram mantidos a uma temperatura de 22° C em um ciclo 12-h claro/12-h escuro (07:00 – 19:00 h), sem restrição de água e comida.

Procedimento Experimental: Os animais foram inicialmente anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital de sódio (50 mg.kg de peso corporal⁻¹). Em seguida, a pele sobre a perna foi cuidadosamente removida, o tendão de aquiles cortado e os músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) rapidamente isolados em solução Krebs Ringer contendo em mM: NaCl 118,5, NaHCO₃ 24,7, KCl 4,7, MgSO₄ 1,18, KH₂PO₄ 1,18, CaCl₂ 2,5 e equilibrada com 95% O₂ - 5% CO₂. Hepes 25 mM e glicose 5 mM foram adicionados e o pH ajustado em 7,4. Imediatamente após o isolamento os músculos foram transferidos para uma cubeta contendo 2,5 mL de meio Krebs Ringer. As extremidades dos tendões foram amarradas em duas astes conectadas a um transdutor isométrico de força (modelo 220, Clevite Brush Mark), de forma que os níveis de força máxima desenvolvidos pelos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) fossem registrados. As distâncias foram reguláveis, de forma que o comprimento (L₀) e a tensão (V) para o ótimo desenvolvimento de força dos músculos fossem alcançados através da calibração. Finalmente, o estímulo elétrico foi aplicado através de dois eletrodos de platina conectados à face externa do músculo.

4.4.4 - ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE MÚSCULO ISOLADO:

Músculo controle: O músculo sóleo ou EDL controle foi mantido por 10 min em 2,5 mL de Krebs Ringer contendo nitróxido (50 μM) e cisteína (200 μM). Em experimentos independentes, SOD (30 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada como sequestrador do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Músculo estimulado: O músculo sóleo ou EDL contralateral foi estimulado eletricamente por 10 min em 2,5 mL de Krebs Ringer contendo nitróxido (50 μM) e cisteína (200 μM). Em experimentos independentes, SOD (30 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionado como sequestrador do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Estimulação intensa: O protocolo consistiu de sessões de 0,7 s com intervalos de 0,1 s de pausa. Dentro das sessões a duração dos estímulos foi de 1 ms com 0,01 s de intervalo de pausa entre os estímulos a uma tensão de 20 ± 3 V.

4.4.5 - DETECÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$:

Amostras de 50 μ L foram coletadas imediatamente após os experimentos para monitoramento da redução do nitróxido para sua correspondente hidroxilamina. Durante todo experimento o meio de reação na cubeta foi agitado e a temperatura mantida em 37° C. Os experimentos realizados em ambiente protegido de luz para evitar a rápida oxidação do nitróxido.

4.4.6 - EXPERIMENTOS EM CULTURAS DE CÉLULAS:

4.4.6.1 - Estimulação elétrica das culturas de células:

As culturas foram estimuladas somente pelo protocolo de alta intensidade conforme descrito anteriormente no item 3.3.

4.4.6.2 - Detecção do $O_2^{\cdot-}$ em culturas:

As células, 6×10^4 por prato, foram lavadas e mantidas a 37° C em 200 μ L de solução Krebs Ringer conforme descrito nos capítulos 1 e 2. Em seguida, as células foram carregadas com nitróxido (50 μ M), cisteína (200 μ M) e estimuladas eletricamente pelo protocolo de alta intensidade durante 10 min. Amostras de 50 μ L foram imediatamente coletadas no meio extracelular e a intensidade de fluorescência do nitróxido reduzido monitorada. Para verificar a especificidade do método SOD (30 U.mL⁻¹) foi adicionado. Durante todo experimento a temperatura foi mantida em 37° C e as amostras protegidas de luz para evitar a rápida oxidação do nitróxido.

5 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO NO *IN VITRO*:

5.1 – NÍVEIS EXTRACELULARES DE CK:

A figura 7 mostra a atividade da enzima CK no meio extracelular como índice de lesão das células musculares em cultura durante a estimulação elétrica. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os níveis de atividade da enzima antes e após o protocolo de estimulação elétrica intensa ($P > 0,05$). Isso, afasta uma possível influência dos níveis de lesão induzidos pelo protocolo de estimulação elétrica sobre a determinação de NO e EROs nos espaços intra e extracelulares.

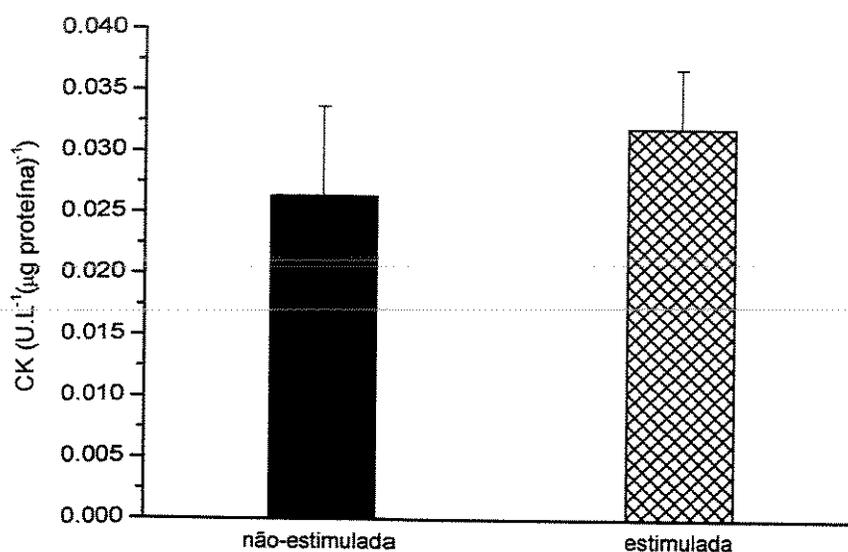


Figura 7: Concentração de CK no meio extracelular antes (barra fechada, $n = 6$) e após 20 min de estimulação elétrica (barra cruzada, $n = 6$) em cultura de células musculares. Valores são médias \pm S.E e $P > 0.05$ entre os grupos.

5.2 – DETERMINAÇÃO DE NO *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS:

A figura 8 mostra as alterações na intensidade de fluorescência do DAF-2 em função da variação das concentrações de SNAP como do doador de NO. O platô da intensidade de fluorescência foi proporcional aos aumentos nas concentrações de NO gerado pelo doador SNAP. A figura no canto superior esquerdo mostra que os aumentos no sinal de fluorescência do DAF-2 foram dose-dependentes quando os valores de pico de fluorescência foram plotados em função das diferentes concentrações de SNAP.

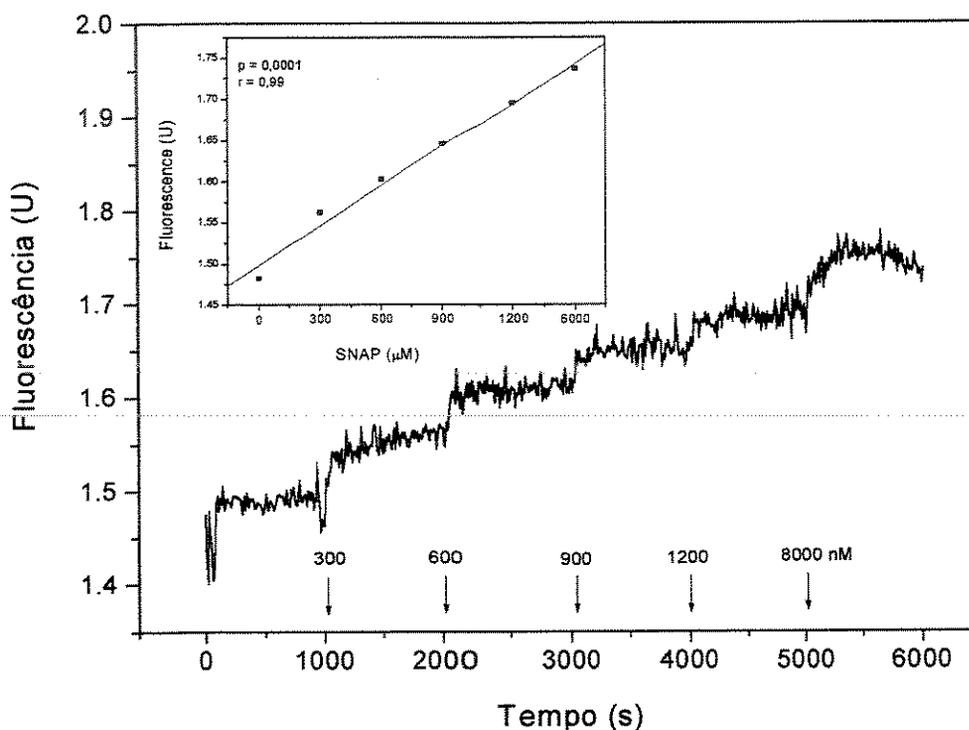


Figura 8: Efeito do NO gerado pelo SNAP na intensidade de fluorescência do DAF-2. A reação foi realizada em 1,5 mL de sulfato de cobre (0,1 M) a 37° C e pH 4,0. A reação foi iniciada pela adição de DAF-2 (10 µM) e SNAP em 6 diferentes concentrações: 0, 300, 600, 900, 1200 e 6000 nM.

5.3 – EFEITO DO NO NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO DAF-2 NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS:

A figura 9 mostra que a adição de hemoglobina, um sequestrador específico do NO inibiu completamente o aumento no sinal de fluorescência do DAF-2, indicando que o sinal de fluorescência na ausência do inibidor é proveniente da reação do DAF-2 com o NO.

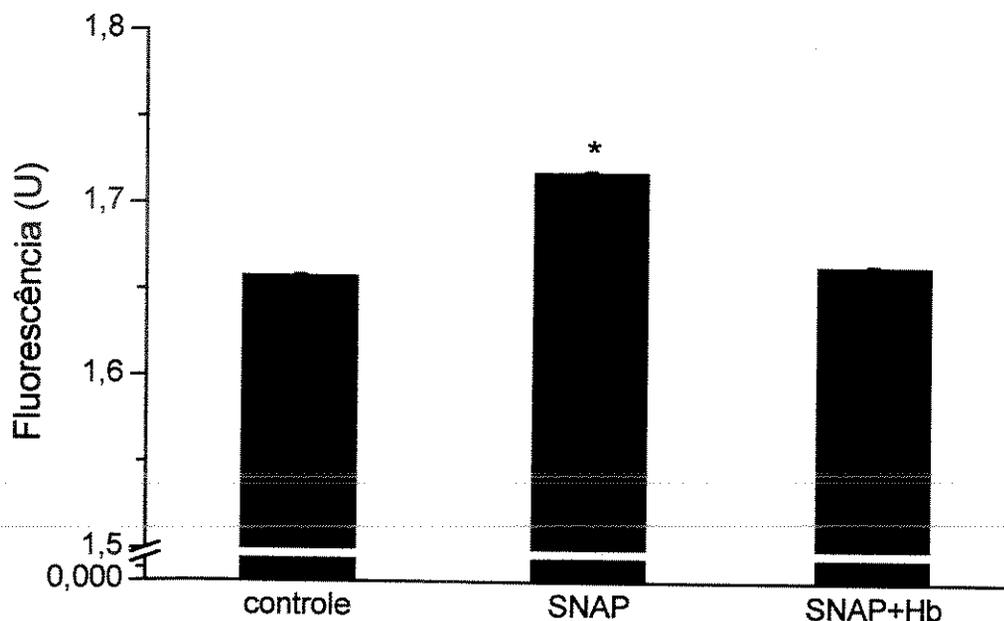


Figura 9: Efeito do doador (SNAP, 6000 nM) e sequestrador do NO (hemoglobina, 1 μ M) na intensidade de fluorescência do DAF-2 (10 μ M). A reação foi realizada em 1,5 mL de sulfato de cobre (0,1 M) a 37 ° C e pH 4,0. Os valores são médias \pm S.E e * P < 0,05 comparado ao controle.

5.4 – DETERMINAÇÃO DE NO EM CULTURAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS:

Como experimento controle foram utilizadas culturas de células endoteliais, um sítio bem estabelecido de produção de NO, para testar o DAF-2 como detector de NO em meio fisiológico. As células foram estimuladas durante 10 min com bradicinina, um potente vasodilatador do tecido endotelial (Barrow et. al., 1986; Mombouli et. al., 1992). A exemplo dos resultados *in vitro* na ausência de células, o DAF-2 confirmou sua sensibilidade na detecção do NO quando os resultados do grupo de células estimuladas foram comparados aos resultados do grupo controle. A adição de bradicinina, portanto, resultou no rápido aumento do sinal de fluorescência do DAF-2 enquanto a especificidade do método ao NO foi confirmada pela adição de L-NA, um inibidor competitivo da NOS.

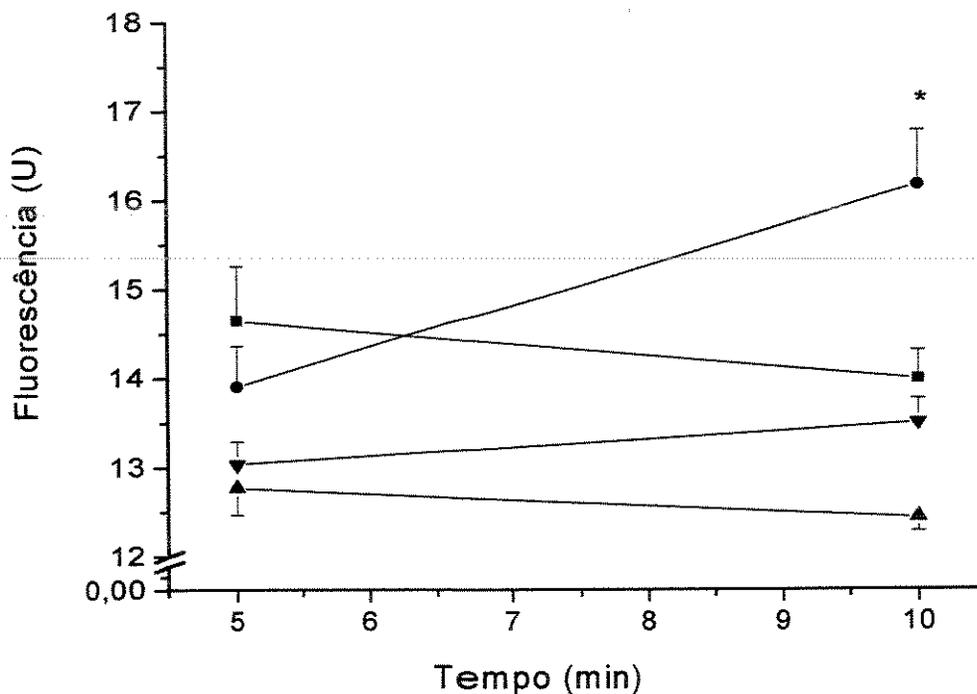


Figura 10: Determinação extracelular do NO através da sonda fluorescente DAF-2 (10 μ M) em culturas de células endoteliais. As células foram estimuladas em solução Krebs Ringer por 10 min com bradicinina (1 μ M) (●, n = 3) e comparadas com as células não estimuladas controles (■, n = 3), controles em meio livre de células (▲, n = 3) e com as células estimuladas na presença de L-NA (300 μ M) (▼, n = 3). Valores são médias \pm S.E e * P < 0,05 comparado aos grupos controles e L-NA.

5.5 – EFEITO DA INTENSIDADE DE ESTIMULAÇÃO NA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE NO:

A figura 11 mostra em cultura de células o efeito da estimulação elétrica na intensidade de fluorescência intracelular do DAF-2. O protocolo de estimulação intensa aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2 em 56,2% (de $0,48 \pm 0,036$ para $0,75 \pm 0,06$ U.mg proteína⁻¹) comparado ao controle não-estimulado ($P < 0,05$). Ao passo que o protocolo de estimulação moderada aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2 em apenas 9,3% (de $0,48 \pm 0,036$ para $0,53 \pm 0,033$ U.mg proteína⁻¹) ($P > 0,05$). Adição de L-NA removeu o sinal intracelular de fluorescência do DAF-2 para valores abaixo do nível basal de controle ($P < 0,05$).

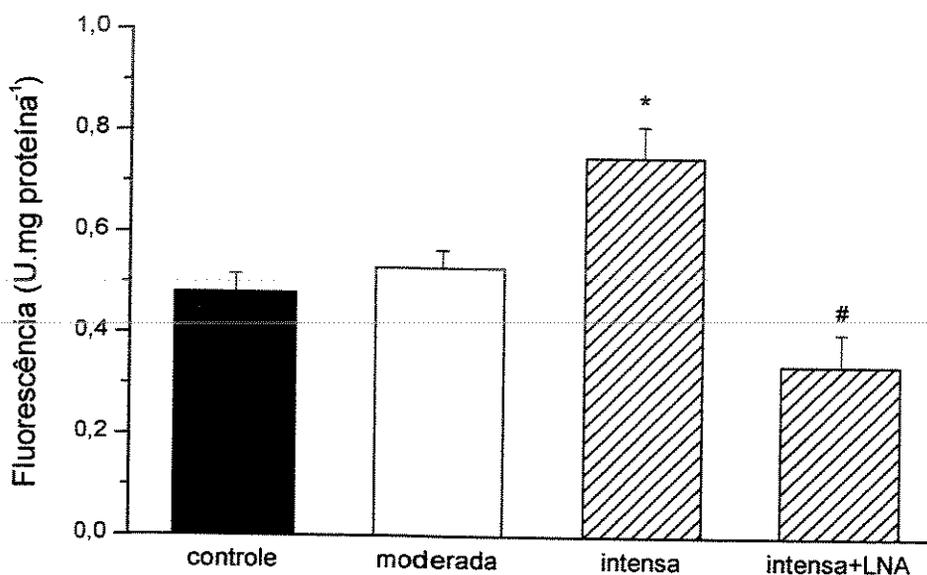


Figura 11: Efeito da estimulação elétrica moderada (n = 9) e intensa (n = 10) durante 20 min na intensidade de fluorescência intracelular do DAF-2 em cultura de célula muscular. L-NA (300 μ M, n = 8) foi adicionada como inibidor da enzima NOS. Os valores são médias \pm S.E e * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle não-estimulado (n = 11). # $P < 0,05$ comparado com estimulação intensa sem inibidor.

5.6 – EFEITO DA INTENSIDADE DE ESTIMULAÇÃO NA PRODUÇÃO EXTRACELULAR DE NO:

A figura 12 mostra em cultura de células o efeito da estimulação elétrica na intensidade de fluorescência extracelular do DAF-2. O protocolo de estimulação intensa aumentou a intensidade de fluorescência do DAF-2 em 20% (de $10,2 \pm 0,9$ para $12,3 \pm 0,8$ U.mg proteína⁻¹) comparado ao controle não-estimulado ($P < 0,05$), ao passo que o protocolo de estimulação moderada não causou nenhum efeito na intensidade de fluorescência do DAF-2 ($P > 0,05$). Adição de L-NA removeu o sinal extracelular de fluorescência do DAF-2 para valores abaixo do nível basal de controle ($P < 0,001$).

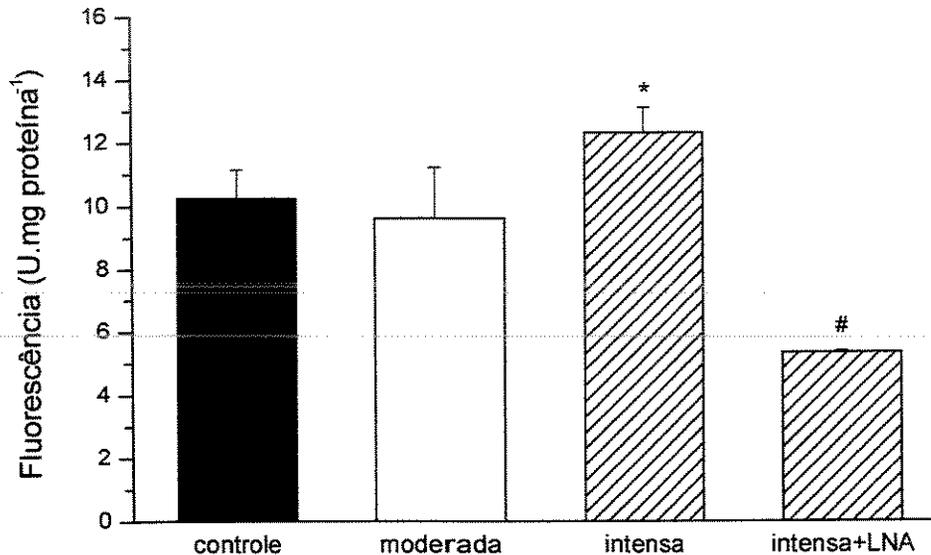


Figura 12: Efeito da estimulação elétrica moderada (n = 9) e intensa (n = 10) durante 20 min na intensidade de fluorescência extracelular do DAF-2 em cultura de célula muscular. L-NA (300 μ M, n = 8) foi adicionada como inibidor da enzima NOS. Os valores são médias \pm S.E e * P < 0,05 comparado ao grupo controle não-estimulado (n = 11). # P < 0,001 comparado com estimulação intensa sem inibidor.

5.7 – EFEITO DO SUBSTRATO ARGININA NA PRODUÇÃO INTRACELULAR DO NO:

Para avaliar se o aumento da concentração de arginina exerce efeito na produção final de NO, foi adicionado ao meio extracelular arginina como substrato da NOS. A figura 13, mostra que a adição desse composto não causou nenhuma alteração na intensidade de fluorescência intracelular do DAF-2 ($P > 0,05$ comparado ao grupo intensamente estimulado).

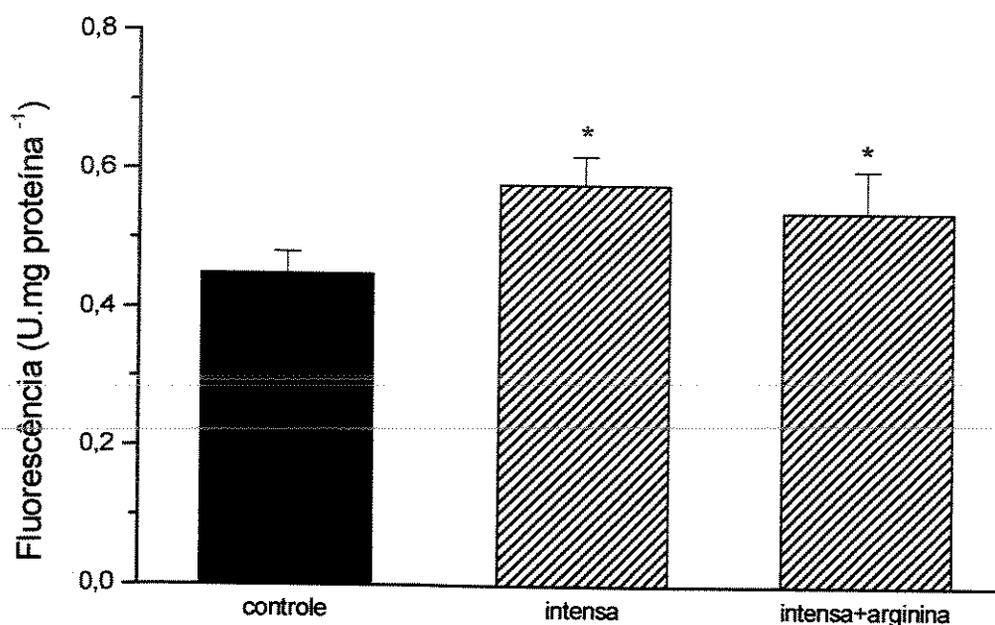


Figura 13: Efeito da adição de arginina (500 μ M) na intensidade de fluorescência intracelular do DAF-2 durante 20 min de estimulação elétrica intensa em cultura de células. Os valores são médias \pm S.E e * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. Os experimentos foram divididos em 3 grupos: controle (n = 11), intensa (n = 10) e intensa + arginina (n = 8).

6 - DISCUSSÃO:

Vários estudos tem proporcionado evidências que NOS é expressa em células do músculo esquelético (Nakane et. al., 1993; Kobzik et. al., 1994;. Frandsen et al. 1996). Porém, existem ainda poucas evidências “diretas” da formação do NO em células musculares durante contrações. No presente estudo nós examinamos a formação de NO em culturas de células musculares induzidas a contrações usando o DAF-2-DA/DAF-2 como marcadores fluorescentes, através da análise de fluorescência no meio intra e extracelular. Os resultados deste estudo mostram que as contrações das fibras musculares provocadas pelo protocolo de estimulação intensa induziram a uma elevada formação de NO pelas células musculares no meio intracelular, seguido de uma alta difusão para o meio extracelular. Por outro lado, as contrações musculares provocadas pelo protocolo de estimulação moderada não induziram um aumento significativo na formação intracelular do NO, conseqüentemente nenhum aumento significativo foi também verificado no meio extracelular, sugerindo que nessas condições a produção de NO foi da mesma magnitude que do grupo controle não-estimulado ($P > 0,05$).

O protocolo de estimulação elétrica intensa resultou em um aumento de 56% e 20% na intensidade de fluorescência intra e extracelular do DAF-2 respectivamente, comparado com o controle não-estimulado ($P < 0,05$). A especificidade do método foi confirmada pela completa remoção do aumento do sinal de fluorescência com a adição do inibidor da NO sintase L-NA ($P < 0,05$), sugerindo que o NO foi responsável pelo aumento intracelular do sinal de fluorescência do DAF-2 e que outras espécies reativas como $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$, H_2O_2 não devem estar envolvidas na reação com DAF-2. Esses dados demonstram que contrações musculares intensas aumentam a formação intracelular de NO e suportam o papel do NO em diferentes funções fisiológicas como a regulação da força de contração (Reid, 1993) e do fluxo sanguíneo (McAllister et. al., 1995) além do aumento da capilarização em associação com a atividade muscular (Wagner, 2001).

É importante observar que a adição de arginina como substrato da NOS não causou nenhum efeito na intensidade de fluorescência emitida pelo DAF-2 no grupo intensamente estimulado. Em contraste, Balon & Nadler (1994) usando o método de quimioluminescência mostraram um aumento significativo na produção de NO em músculo

esquelético incubado com arginina e comparado ao controle. A razão para essas discrepâncias é desconhecida, mas poderia certamente ser atribuída ao uso dos diferentes métodos empregados na determinação de NO, aos diferentes tipos de células e às diferentes condições experimentais.

Embora o aumento relativo na intensidade de fluorescência intracelular do DAF-2 tenha sido várias vezes superior ao aumento extracelular, os valores absolutos de intensidade de fluorescência extracelular do DAF-2 foram maiores comparado aos valores de fluorescência intracelular. Esses achados mostram que o NO produzido no meio intracelular é amplamente liberado para o meio extracelular. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Balon & Nadler (1994), os quais, utilizando o método de quimioluminescência, mostraram um aumento de 140% na liberação de NO no meio extracelular de músculo esquelético isolado após estimulação elétrica. Porém, em músculo isolado o sistema vascular contendo NOS, não pode ser completamente removido dificultando a interpretação dos resultados. Em um outro estudo, Tidball et al. (1998), usando um método espectrofotométrico, determinaram a produção basal de NO em músculo esquelético isolado e em cultura de célula muscular. Seus resultados mostraram que o estresse mecânico induzido e a estimulação elétrica aumentaram a produção basal de NO em músculo sóleo em 20% e em cultura de célula muscular em 42%. Apesar da detecção dos aumentos significativos na produção de NO, os autores neste estudo não removeram o sinal do marcador de NO utilizado através de um inibidor específico da NOS, tornando incerta a especificidade do método ao NO. Portanto, por causa das limitações metodológicas, os estudos acima ainda proporcionam poucas evidências que o NO é produzido pelo músculo esquelético durante contrações. Por outro lado, nossos achados mostraram que quando as células musculares são induzidas a contrações intensas o NO produzido é amplamente liberado para o meio extracelular. Esse aumento extracelular pode ser de grande importância para as células musculares durante as contrações, evitando a formação intracelular de uma das mais potentes espécies reativas como o peroxinitrito (ONOO), pela interação do $O_2^{\cdot -}$ com NO (Beckman et. al., 1990). Igualmente importante é que muitas das funções fisiológicas do NO, incluindo a regulação do fluxo sanguíneo (McAllister et. al., 1995) e aumento da capilarização (Wagner, 2001) requerem que o NO seja liberado do meio intra para o meio extracelular. Em adição, tem sido mostrado que o

NO pode regular o fluxo sanguíneo no músculo esquelético durante o exercício (McAllister et. al., 1995). Assim, o nível elevado de NO poderia ser um importante sinal para aumentar o fluxo sanguíneo durante o exercício intenso acomodando a elevada demanda metabólica do tecido muscular (Corcondilas et. al., 1964; McAllister et. al., 1995).

Em conclusão, os dados deste estudo confirmaram as células musculares como importante sítio de formação de NO e que a sonda fluorescente DAF-2 pode ser usada como um detector sensível e altamente específico da molécula de NO em condições fisiológicas. Nossos resultados sugerem ainda que a alta capacidade de difusão do NO como evidenciado pelo altos níveis de NO no meio extracelular pode constituir um importante mecanismo de defesa evitando a formação intracelular de uma das mais potentes espécies reativas o $\cdot\text{ONOO}$.

7 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ *IN VITRO*:

7.1 – DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS:

A figura 14 mostra as alterações na intensidade de fluorescência do DCFH em função da variação das concentrações de H₂O₂. Os aumentos na intensidade de fluorescência do DCFH oxidado foram dependentes dos aumentos nas concentrações de H₂O₂. A figura no canto superior esquerdo mostra que a taxa de fluorescência do DCFH oxidado exibiu um aumento linear em função da concentração de H₂O₂.

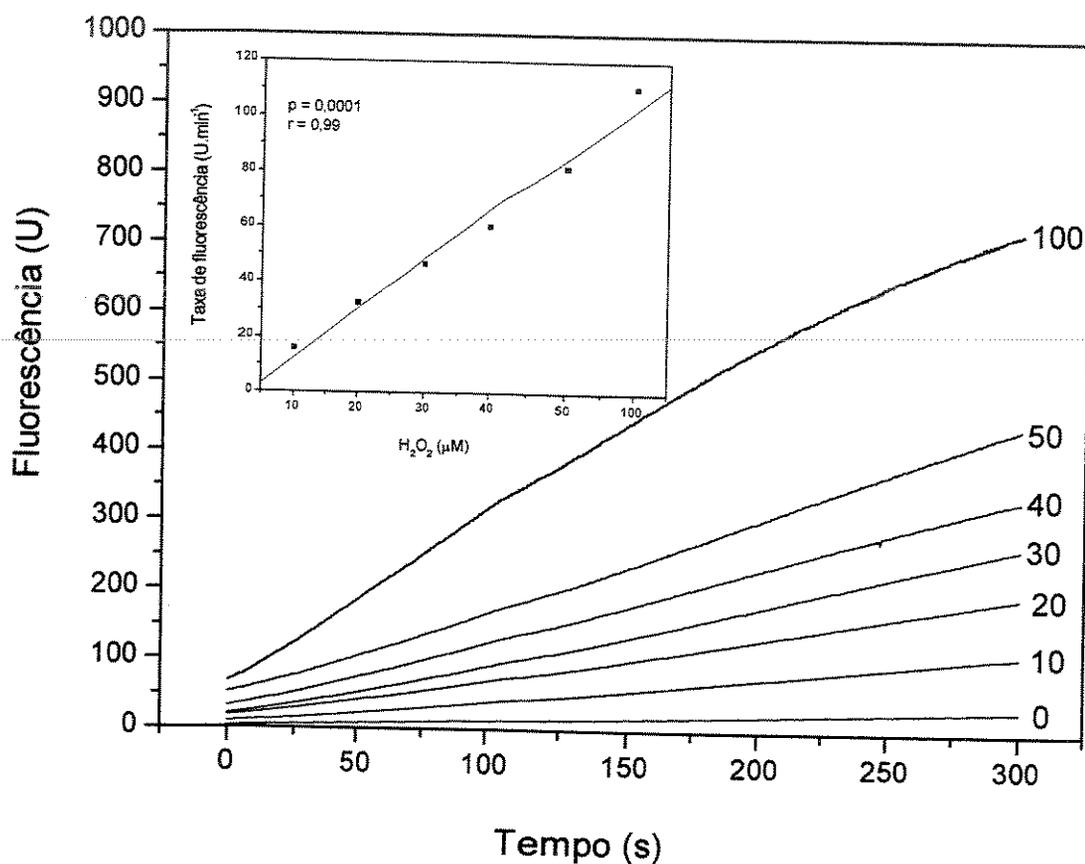


Figura 14: Curva dose-resposta da oxidação do DCFH em função da variação da concentração de H₂O₂. O ensaio foi realizado a 37° C em 1 mL de Tris-HCL (40 mM), pH 7,4 contendo citocromo c (10 µM) e H₂O₂ (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 100 µM).

7.2 – EFEITO DE DIFERENTES EROs E NO NA OXIDAÇÃO DO DCFH:

Não sendo o DCFH específico para H_2O_2 , procuramos determinar nas nossas condições experimentais, qual ou quais EROs e NO gerados estariam afetando a oxidação do DCFH. O experimento apresentado abaixo foi realizado para testar o efeito de diferentes EROs e do NO na oxidação do DCFH em meio ausente de células. Os antioxidantes CAT (300 U.mL^{-1}), SOD (30 U.mL^{-1}) e DMSO (10 mM) foram usados para determinar o efeito do H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$ respectivamente, na oxidação do DCFH no sistema XA/XO. Hemoglobina (Hb, $1\mu\text{M}$) foi adicionada como sequestrador do NO no meio contendo doador de NO (SNP). A figura 15 mostra a geração de EROs pelo sistema XA/XO e que a adição de CAT ao sistema XA/XO diminuiu o sinal de fluorescência do DCFH para o nível do controle ($P < 0,05$). A adição de DMSO removeu parcialmente o sinal de fluorescência ($P < 0,05$), enquanto a SOD não causou nenhum efeito ($P > 0,05$). O doador de NO (SNP) aumentou significativamente a oxidação do DCFH ($P < 0,05$), ao passo que a adição de Hb removeu o sinal ($P < 0,05$).

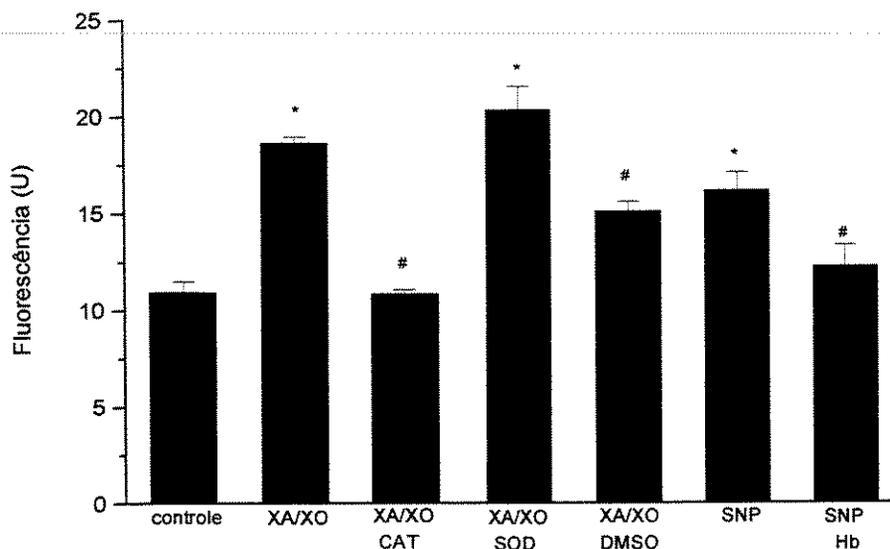


Figura 15 – Efeito de diferentes EROs e NO na oxidação do DCFH em meio livre de células. As EROs foram geradas pelo sistema XA ($5 \times 10^{-4}\text{ M}$)/XO ($0,0001\text{ U.mL}^{-1}$) e o NO foi gerado pelo doador SNP. Ambos experimentos foram realizados em KH_2PO_4 (50 mM) contendo DCFH ($1\text{ }\mu\text{M}$) a 37° C e pH 7,4 durante 300 s. Os valores são médias \pm S.E de 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ comparado ao controle. # $P < 0,05$ comparado com XA/XO.

7.3 – EFEITO DA INTENSIDADE DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA OXIDAÇÃO INTRACELULAR DO DCFH:

A figura 16 mostra em cultura de células que o protocolo de estimulação elétrica intensa aumentou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF em 171% (de $5,98 \pm 2,4$ para $16,24 \pm 1,9$ U.mg proteína⁻¹) comparado ao controle não-estimulado ($P < 0,05$), ao passo que o protocolo de estimulação moderada aumentou a intensidade de fluorescência do DCF em somente 22% (de $5,98 \pm 2,4$ para $7,3 \pm 2,1$ U.mg proteína⁻¹) ($P > 0,05$).

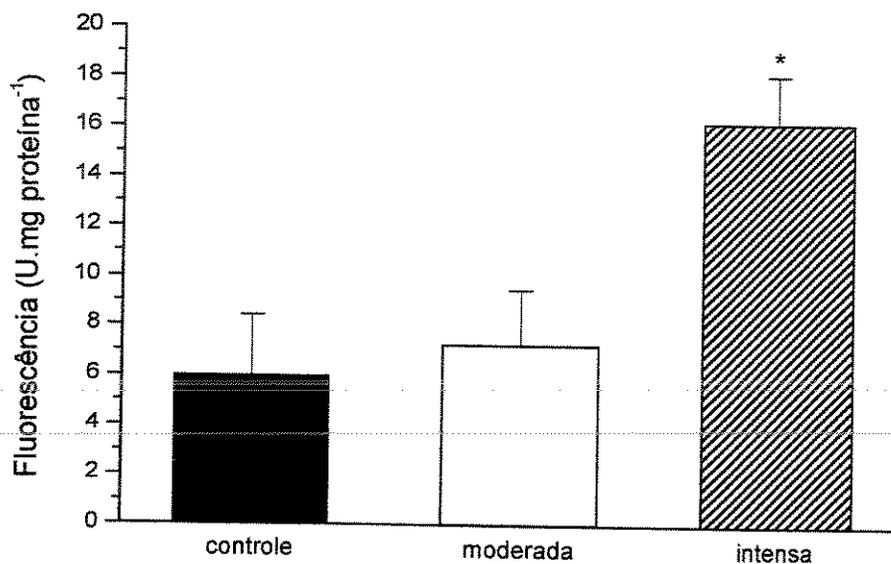


Figura 16: Efeito da estimulação elétrica moderada (n = 9) e intensa (n = 10) durante 20 min na oxidação intracelular do DCFH em cultura de célula muscular. Os valores são médias \pm S.E e * $P < 0,05$ comparado ao controle não-estimulado (n = 11).

7.4 - EFEITO DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES NA OXIDAÇÃO INTRACELULAR DO DCFH:

A figura 17 mostra em cultura de células que a adição de GSH ou tiron antes da estimulação elétrica intensa removeu completamente o sinal de fluorescência intracelular do DCF ($P < 0,05$), enquanto a adição de L-NA ou DMSO não causou nenhum efeito na oxidação do DCFH ($P > 0,05$). GSH (0,5 mM, $n = 8$), Tiron (1mM, $n = 10$), DMSO (10 mM, $n = 10$) foram adicionados como sequestradores do H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ e $\cdot OH$ respectivamente. L-NA (300 μM , $n = 8$) foi adicionado como um inibidor da enzima NOS.

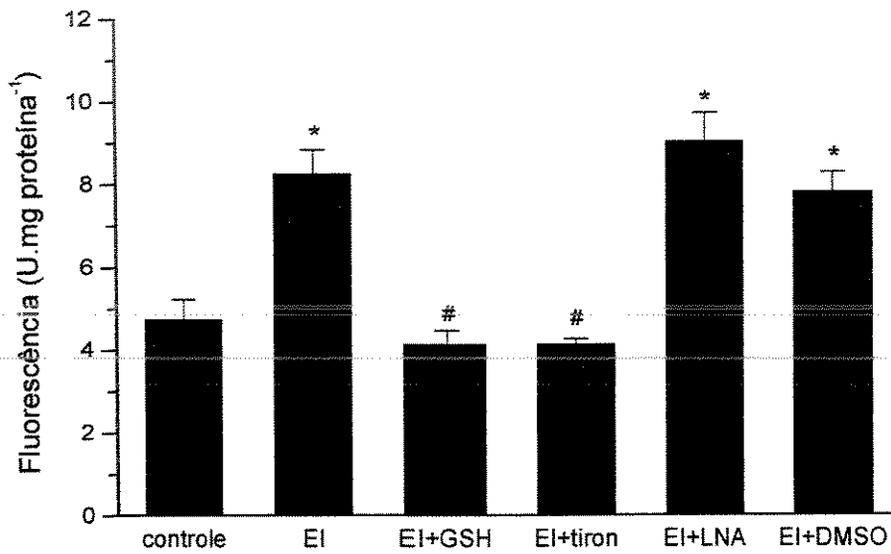


Figura 17: Efeito de diferentes antioxidantes e do inibidor L-NA na oxidação intracelular do DCFH durante 20 min de estimulação elétrica intensa (EI) em culturas de células musculares. Os valores são médias \pm S.E., * $P < 0,05$ comparado ao grupo não-estimulado (controle, $n = 12$) e # $P < 0,05$ comparado ao EI ($n = 8$).

7.5 – EFEITO DA INTENSIDADE DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NA OXIDAÇÃO EXTRACELULAR DO DCFH:

A figura 18 mostra em cultura de células que o protocolo de estimulação elétrica intensa aumentou a intensidade de fluorescência extracelular do DCF em 105% ($65,5 \pm 8,0$ vs $134,3 \pm 10,3$ U.mg proteína⁻¹) comparado com controle não-estimulado ($P < 0,001$), ao passo que o protocolo de estimulação moderada não causou nenhum efeito na intensidade de fluorescência do DCF ($P > 0,05$).

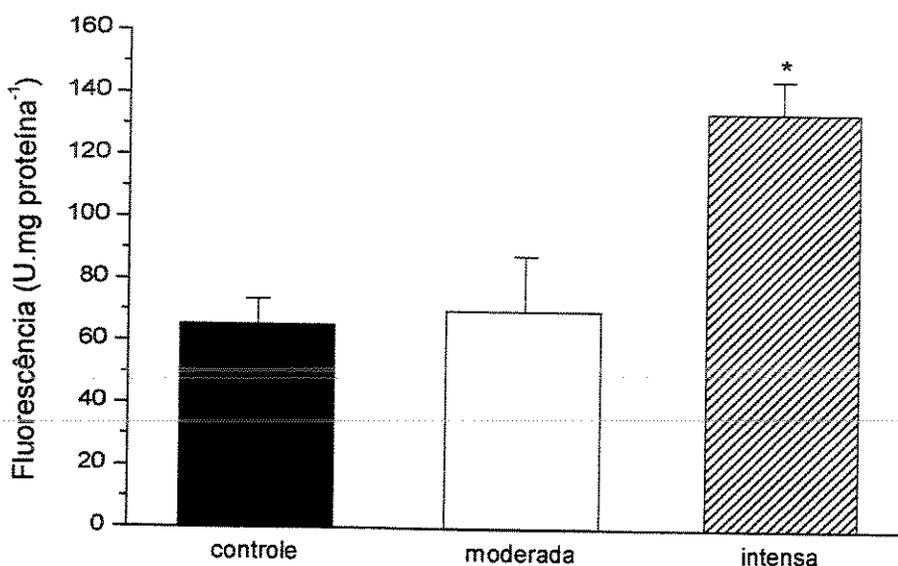


Figura 18: Efeito da estimulação elétrica moderada (n = 9) e intensa (n = 10) durante 20 min na oxidação extracelular do DCFH em culturas de células musculares. Os valores são médias ± S.E e * $P < 0,001$ comparado ao grupo controle não-estimulado (n = 11).

7.6 - EFEITO DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES NA OXIDAÇÃO EXTRACELULAR DO DCFH:

A figura 19 mostra em cultura de células que a adição de GSH-PX removeu o sinal de fluorescência do grupo EI em 131% ($111 \pm 2,4$ vs $48,3 \pm 3,9$ U.mg proteína⁻¹) ($P < 0,001$), enquanto GSH isolado removeu o sinal de fluorescência em somente 21% ($111 \pm 2,4$ vs $91,6 \pm 5,1$ U.mg proteína⁻¹) ($P > 0,05$). A adição de CAT, SOD, CAT+SOD, D-fenilalanina ou L-NA não causou nenhum efeito na oxidação extracelular do DCFH ($P > 0,05$) comparado ao grupo EI. GSH (0,5mM, n = 8), GSH(0,5 mM)-PX (5 U. mL⁻¹, n = 10) e CAT (300 U.mL⁻¹, n = 8) foram adicionados como sequestradores do H₂O₂. SOD (30 U.mL⁻¹, n = 7) e CAT (300 U.mL⁻¹) + SOD (30 U.mL⁻¹, n = 7) foram adicionados como sequestradores do O₂⁻ e O₂⁻ + H₂O₂ respectivamente. D-fenilalanina (1 mM, n = 10) e L-NA (300 μM, n = 8) foram adicionados como sequestrador do [•]OH e inibidor da enzima NOS respectivamente.

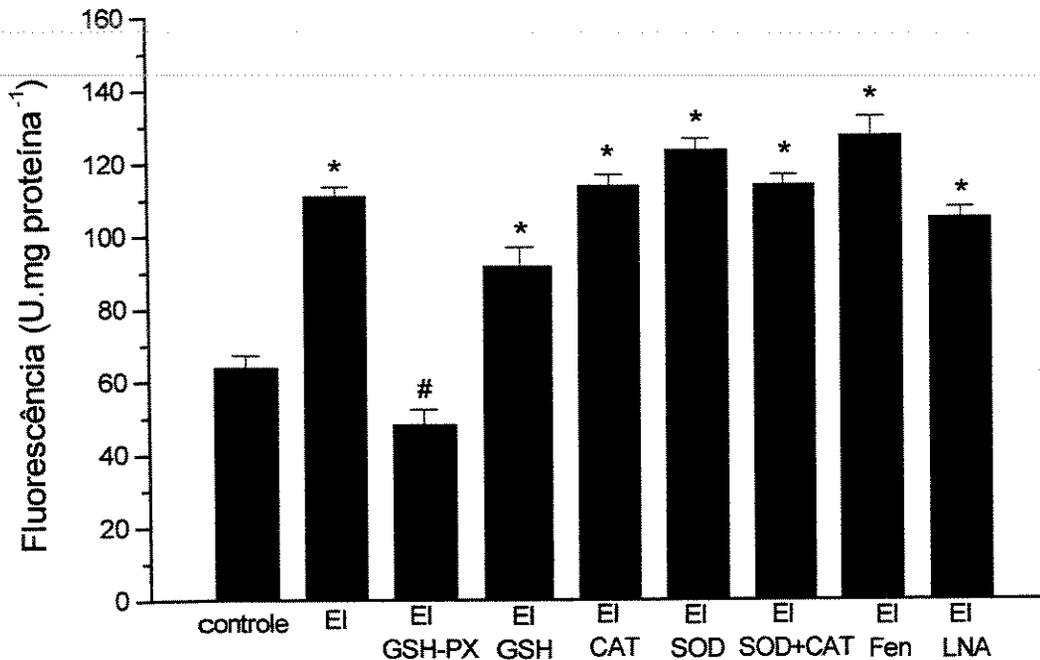


Figura 19: Efeito de diferentes antioxidantes na oxidação extracelular do DCFH durante 20 min de estimulação intensa (EI) em culturas de células musculares. Os valores são médias \pm S.E e * $P < 0,05$ comparado ao controle (não-estimulado, n = 11). # $P < 0,001$ comparado ao EI (n = 10).

8 – DISCUSSÃO:

A sonda fluorescente DCFH tem sido amplamente utilizada na detecção de EROs em uma variedade de tecidos, incluindo o tecido muscular, nervoso e leucócitos (Bass et. al., 1983; Szejda et. al., 1984; Burow & Valet, 1987; Kehrer & Paraidathathu, 1992; Carter et. al., 1994; Murrant et. al., 1999). A principal característica desse método está na capacidade da sonda reagir com diferentes EROs e a grande vantagem é que o DCFH ligado ao grupo diacetato (DCFH-DA) pode facilmente atravessar a membrana das células permitindo a análise da formação de EROs no meio intracelular. No presente estudo nós investigamos o efeito das contrações induzidas eletricamente em culturas de células musculares esqueléticas na formação de EROs no meio intra e extracelular, usando o DCFH/DCFH-DA como um marcador fluorescente. Nossos resultados mostraram que as contrações induzidas por 20 min de estimulação intensa aumentaram em 170% a intensidade do sinal de fluorescência intracelular do DCFH comparado ao controle não estimulado, enquanto a estimulação moderada não induziu nenhum efeito na oxidação intracelular do DCFH (figura 16). A adição de GSH antes da estimulação elétrica inibiu completamente o aumento na intensidade de fluorescência sugerindo que o H_2O_2 foi o principal responsável pela oxidação do DCFH. Tiron, um composto lipofílico com alta capacidade de sequestrar o $O_2^{\cdot-}$, também removeu o aumento do sinal de fluorescência, porém, considerando que a oxidação do DCFH foi completamente removida pela GSH, é provável que o efeito do tiron tenha sido via uma diminuição na formação intracelular do H_2O_2 . Essa hipótese baseia-se no fato de que tem sido mostrado que o tiron pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ produzindo $HO_2^{\cdot-}$ e o radical tiron oxidado TH, como previamente descrito (Greenstock & Miller, 1975). Em adição, a presença de SOD ao meio livre de células não reduziu o sinal do DCF, sugerindo que o $O_2^{\cdot-}$ tem baixa afinidade pelo DCFH. Entretanto, a adição de DMSO nos experimentos livres de células (figura 15) mostraram que o $\cdot OH$ foi capaz de oxidar o DCFH, embora em proporções menores que o H_2O_2 , o que está em acordo com estudos anteriores em diferentes tipos de células incluindo leucócitos e células neurais (Rao et. al., 1992; Gunasekar et. al., 1995). No entanto, $\cdot OH$ parece não ser formado em quantidades mensuráveis intracelularmente em culturas de células durante contrações, uma vez que a adição de DMSO não alterou a oxidação do DCFH (figura 17). Esta

observação está em contraste com os achados de O'Neill et al. (1996) os quais utilizando a hidroxilação da fenilalanina observaram um significativo aumento nos níveis do radical $\cdot\text{OH}$ em músculo de animais durante contração *in vivo*. Essa discrepância poderia ser explicada pelas diferenças nos modelos experimentais, como por exemplo, a possibilidade de existir uma maior quantidade de ferro no meio extracelular *in vivo* que em culturas de células, ou ainda, pela diferença na sensibilidade ao $\cdot\text{OH}$ entre os métodos. Nossos dados suportam portanto o efeito do H_2O_2 e descartam a participação de outras espécies na oxidação intracelular do DCFH sugerindo que o H_2O_2 deva mesmo ser a principal espécie reativa envolvida na oxidação do DCFH durante as contrações induzidas em células musculares, pelo menos em condições fisiológicas como ocorreu em nossos experimentos.

Devido a sua alta difusão pela membrana celular, o H_2O_2 formado no citoplasma das células musculares não pode ser totalmente detectado pelo DCFH no meio intracelular. Além de sua natural difusão para o meio extracelular, o DCFH estaria ainda sempre em competição com o sistema de defesa antioxidante, incluindo a GPX, CAT e outros compostos de defesa não enzimáticos. Em adição, o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ capaz de gerar o H_2O_2 pode alcançar o espaço extracelular, uma vez que estudos anteriores tem mostrado o efluxo dessa espécie via canais de membrana (Lynch & Fridovich, 1978; Reid et. al., 1992). Então, uma vez que a medida absoluta da formação intracelular de EROs ainda é uma tarefa complicada, nós investigamos também o efeito das contrações induzidas eletricamente na oxidação extracelular do DCFH. Os resultados mostraram um aumento significativo de 105% na oxidação do DCFH após 20 min de estimulação intensa comparados aos valores do controle não-estimulado (figura 18). O aumento relativo na oxidação extracelular do DCFH foi menor que os valores de oxidação intracelular, embora os valores absolutos para a oxidação extracelular do DCFH tenham sido várias vezes maiores que os valores intracelulares. A razão para essa diferença entre os valores absolutos entre o meio intra e extracelular imediatamente após a estimulação elétrica pode ser atribuído a maior capacidade antioxidante intracelular.

A inibição do sinal de fluorescência na presença do sistema GSH-PX mostra que a ERO responsável pela oxidação extracelular do DCFH é o H_2O_2 , confirmado pelo fato da adição de SOD isoladamente, combinada com a CAT ou de D-fenilalanina (Halliwell & Kaur, 1997) como sequestrador extracelular do $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{O}_2^{\cdot-}-\text{H}_2\text{O}_2$ e $\cdot\text{OH}$ respectivamente,

não ter exercido qualquer efeito na oxidação do DCFH. Surpreendentemente, a adição isolada de CAT não teve qualquer efeito no sinal de fluorescência da oxidação extracelular do DCFH. No entanto, o sinal foi completamente removido pela adição de GSH-PX e parcialmente reduzido pela adição de GSH isoladamente como mostra a figura 19. Isso significa que muito provavelmente nos experimentos com DCFH-DA a adição de GSH serviu de substrato para a enzima GPX na remoção do H_2O_2 (figura 15). Em acordo com nossos achados, outros estudos também falharam para mostrar o efeito antioxidante da CAT na oxidação do DCFH. Tatla et. al. (1999) foram também incapazes de inibir a oxidação do DCFH em leucócitos usando CAT como sequestrador de H_2O_2 . Em outro estudo, Reyk et al. (2001) verificaram que a resposta induzida pela estimulação dos linfócitos com PMA (Forbol 12-miriestato 13-acetato) na oxidação do DCFH foi parcialmente reduzida na presença de CAT e ao contrário completamente inibida com adição de GSH-PX. Chance et. al., (1979) sugeriram que a CAT trabalha como uma “válvula de segurança” removendo H_2O_2 quando ele é produzido em grandes quantidades pelos peroxissomos durante a β -oxidação dos ácidos graxos. Porém, os peroxissomos são importantes sítios de produção de H_2O_2 apenas em condições de jejum, bem como durante o exercício prolongado, quando os ácidos graxos são a fonte de energia primária para o tecido muscular (Godin & Wohaieb, 1988). Ao contrário, GPX é mais eficiente para remover o H_2O_2 produzido em baixas concentrações no citosol e mitocôndria (Chance et. al., 1979). Em um importante artigo de revisão na área, Yu (1994) sugere que em tecido muscular de mamíferos, GPX tem uma maior afinidade pelo H_2O_2 em baixas concentrações do que CAT. Então, com base nas afirmações acima e nos nossos resultados, podemos sugerir que a produção de H_2O_2 em nosso experimento foi abaixo do K_m para atividade da CAT.

Nenhum efeito do NO na oxidação intra ou extracelular do DCFH foi observado como indicado pela ausência de redução no sinal de fluorescência do DCFH na presença do inibidor L-NA. Observações em nosso laboratório e de estudos anteriores (Rao et. al., 1992; Gunasekar et. al., 1995) em meio livre de células mostraram que o NO claramente pode induzir oxidação do DCFH, e ainda nossos experimentos com DAF-2 exibidos no Capítulo 1, mostram que o NO foi formado em células musculares. Uma possível explicação para a falha do DCFH na detecção do NO pode ser explicada por uma menor sensibilidade desta

sonda quando comparada ao DAF-2. Combinados, nossos resultados sugerem que o aumento na oxidação no meio intra e extracelular do DCFH durante as contrações musculares foi muito provavelmente devido à formação de H_2O_2 , com pouca contribuição de outras espécies como o $O_2^{\cdot -}$, $^{\cdot}OH$ ou NO . Comparados, os resultados da oxidação do DCFH intra e extracelular sugerem que uma grande porcentagem do H_2O_2 produzido no meio intracelular alcança o meio extracelular. Portanto, se partimos do princípio de que a mitocôndria é o principal sítio de formação do H_2O_2 durante o exercício seria adequado admitir que a alta permeabilidade da membrana celular ao H_2O_2 constitui um importante mecanismo de defesa contra os oxidantes formados pelos processos metabólicos, evitando a formação intracelular de uma das mais potentes EROs, o $^{\cdot}OH$.

A análise final de nossos resultados demonstra uma maior formação de EROs para intensidades mais altas de contrações. Esses resultados, portanto, poderiam ser explicados com base nos achados do clássico estudo de Chance & Williams (1956), os quais mostraram que aproximadamente 2-3% do O_2 mitocondrial consumido é transformado em EROs. Então, se considerarmos que durante a atividade muscular intensa o consumo de O_2 pelas células musculares é muitas vezes aumentado comparado à estimulação moderada, seria lógico esperar uma maior produção de EROs durante o protocolo de estimulação intensa. Sob essas condições, a capacidade de defesa antioxidante pode ser superada resultando na ocorrência de estresse oxidativo (Pryor, 1986; Clanton et. al., 1999). Por outro lado, o protocolo de estimulação moderada não aumentou a intensidade de fluorescência do DCFH, sugerindo que a formação de EROs foi de uma magnitude limitada, podendo facilmente ser neutralizada pelo sistema de defesa antioxidante (Yu, 1994).

A comparação dos resultados intra e extracelulares sugerem que a sonda fluorescente DCFH em condições fisiológicas é mais sensível ao H_2O_2 comparado às demais espécies reativas em tecido muscular. Nossos resultados indicam ainda que as contrações das células musculares induzem a formação do H_2O_2 intracelular e que o aumento da sua formação é maior para intensidades de estímulos mais altos. Nessas condições, o efluxo do H_2O_2 é aumentado, tornando o meio extracelular um atrativo compartimento para análise da formação do H_2O_2 em células musculares.

9 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO H₂O₂ *IN VIVO*:

9.1 - OXIDAÇÃO *IN VITRO* DO DCFH-BSA:

Os experimentos foram realizados para testar o uso da sonda DCFH-BSA como um detector do H₂O₂ em combinação com a técnica de microdiálise. A figura 20 mostra o efeito de diferentes concentrações de H₂O₂ na intensidade de fluorescência do DCFH na presença de citocromo c. Os aumentos na intensidade de fluorescência do DCFH foram dependentes dos aumentos das concentrações de H₂O₂. Como indicado pela seta na figura abaixo, o sistema antioxidante GSH-PX removeu completamente o sinal de fluorescência do DCFH para a mais alta concentração de H₂O₂ utilizada.

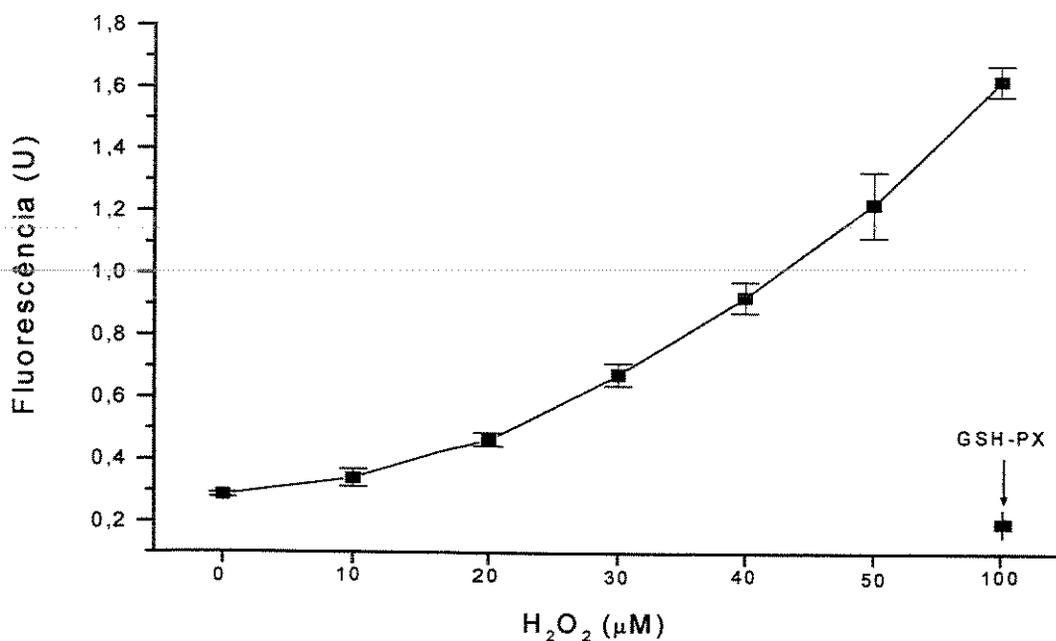


Figura 20: Os valores representam a oxidação do DCFH-BSA pelo H₂O₂ (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 100 µM) em combinação com a técnica de microdiálise. As amostras foram coletadas a cada 10 min no dialisado a uma taxa de fluxo de 2,5 µL.min⁻¹. Os antioxidantes GSH (0,5 mM)-PX (5 U.mL⁻¹) foram adicionados para inibir a oxidação do DCFH. Os dados foram coletados de 2 experimentos independentes.

9.2 – OXIDAÇÃO *IN VITRO* DO DCFH:

O efeito antioxidante da CAT e GSH-PX foi testado *in vitro* com diferentes concentrações de H₂O₂. A tabela abaixo mostra os valores médios ± DP da oxidação do DCFH para 3 diferentes concentrações de H₂O₂, na ausência e na presença de CAT ou GSH-PX. Os resultados mostraram um maior efeito antioxidante da GSH-PX comparado ao efeito da CAT para a concentração de 10 nM de H₂O₂. Nenhuma diferença foi verificada para a concentração de 10³ nM de H₂O₂, ao passo que para a concentração de 10⁵ nM o efeito da CAT foi maior comparado a GSH-PX.

Tabela I – Efeito antioxidante da CAT (300 U.mL⁻¹) e GSH (0,5 mM)-PX (5 U.ml⁻¹) na oxidação do DCFH em diferentes concentrações de H₂O₂. A reação foi realizada a 37° C em 1 mL de Tris-HCL (40 mM), pH 7,4, citocromo c (10 µM) e H₂O₂ (10, 10³ e 10⁵ nM). n = 3 experimentos independentes.

INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO DCFH (Unidades)

	H ₂ O ₂		
	10 nM	10 ³ nM	10 ⁵ nM
Controle	37,3 ± 1,5	42 ± 1,5	722 ± 7,5
GSH-PX	28,6 ± 0,8 * †	32,2 ± 1,0 *	61,0 ± 2,6 * †
CAT	40,6 ± 1,8	33,0 ± 1,8 *	36,6 ± 1,4 *

* P < 0,05 comparado com o controle.

† P < 0,05 comparado com CAT.

9.3 - DETERMINAÇÃO *IN VIVO* DOS NÍVEIS DE H₂O₂ PELA OXIDAÇÃO DO DCFH-BSA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICRODIÁLISE:

A figura 21 mostra o efeito da estimulação intensa na oxidação do DCFH *in vivo* utilizando a técnica de microdiálise. A intensidade de fluorescência do DCFH aumentou com o início da estimulação elétrica, como mostram as alterações nos “slopes” das curvas quando comparado aos valores de linha de base. Os valores de fluorescência atingiram um platô ao término da estimulação elétrica, seguidos de uma tendência de declínio no final do período de recuperação.

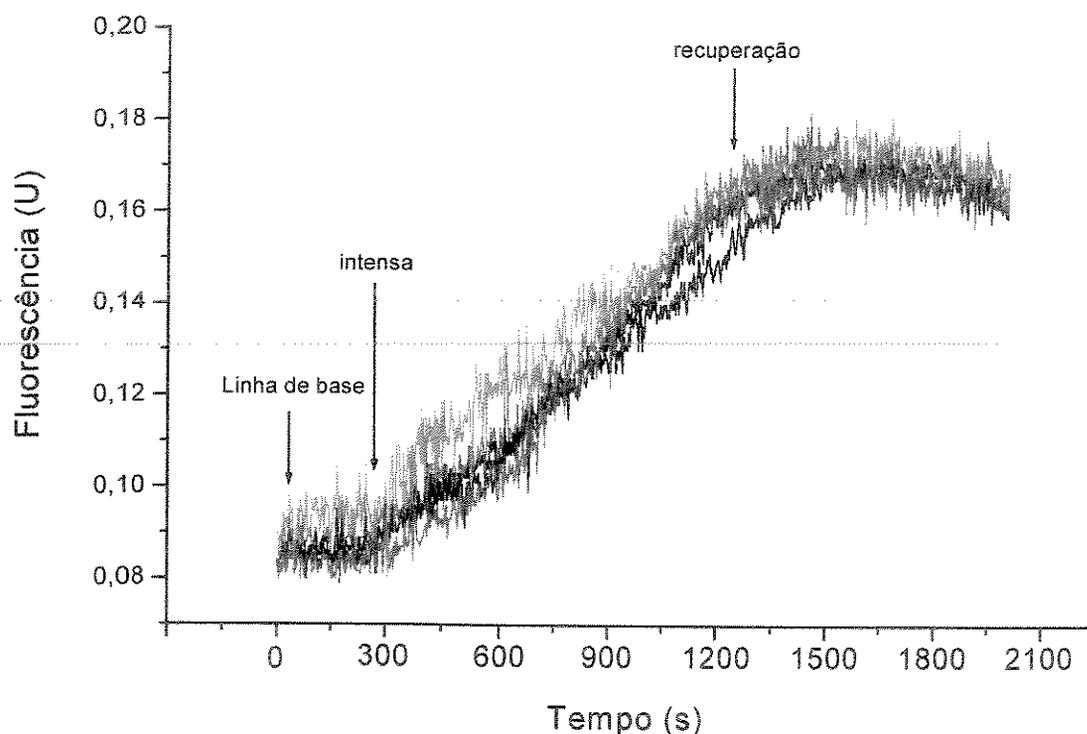


Figura 21: Determinação “on-line” do H₂O₂ intersticial pela oxidação do DCFH em combinação com a técnica de microdiálise em ratos durante contrações intensas. Os valores de fluorescência representam as concentrações de H₂O₂ no dialisado a uma taxa de fluxo de 0.1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados representam 5 experimentos independentes.

9.4 - EFEITO DA CAT NA OXIDAÇÃO DO DCFH-BSA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICRODIÁLISE *IN VIVO*:

A figura 22 mostra o efeito da CAT na oxidação do DCFH *in vivo* utilizando a técnica de microdiálise em ratos durante o exercício. É importante observar que a CAT não foi capaz de inibir a oxidação do DCFH durante o protocolo de estimulação elétrica quando comparado aos valores de linha de base.

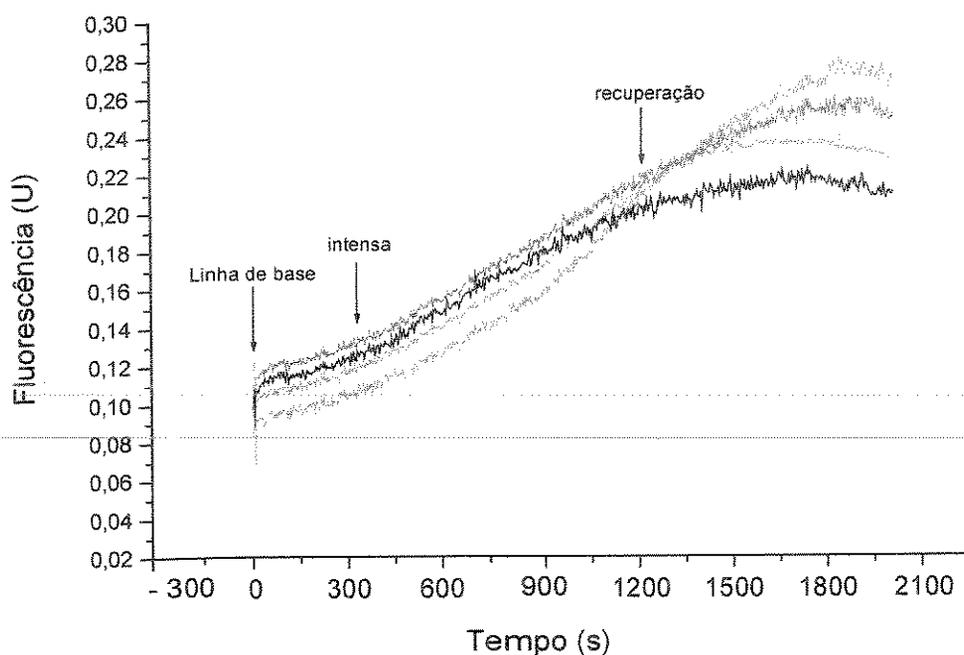


Figura 22: Efeito da CAT (300 U.mL^{-1}) na oxidação do DCFH-BSA pelo H_2O_2 intersticial em combinação com a técnica de microdiálise em ratos durante contrações intensas. Os valores de fluorescência representam as concentrações de H_2O_2 no dialisado a uma taxa de fluxo de $0,1 \mu\text{L.min}^{-1}$. Os dados representam 5 experimentos independentes.

9.5 - EFEITO DA GSH-PX NA OXIDAÇÃO DO DCFH-BSA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICRODIÁLISE *IN VIVO*:

A figura 23 mostra o efeito da GSH-PX na oxidação do DCFH *in vivo* utilizando a técnica de microdiálise em ratos durante o exercício. É importante observar que a GSH-PX removeu completamente oxidação do DCFH durante o protocolo de estimulação elétrica quando comparado aos valores de linha de base.

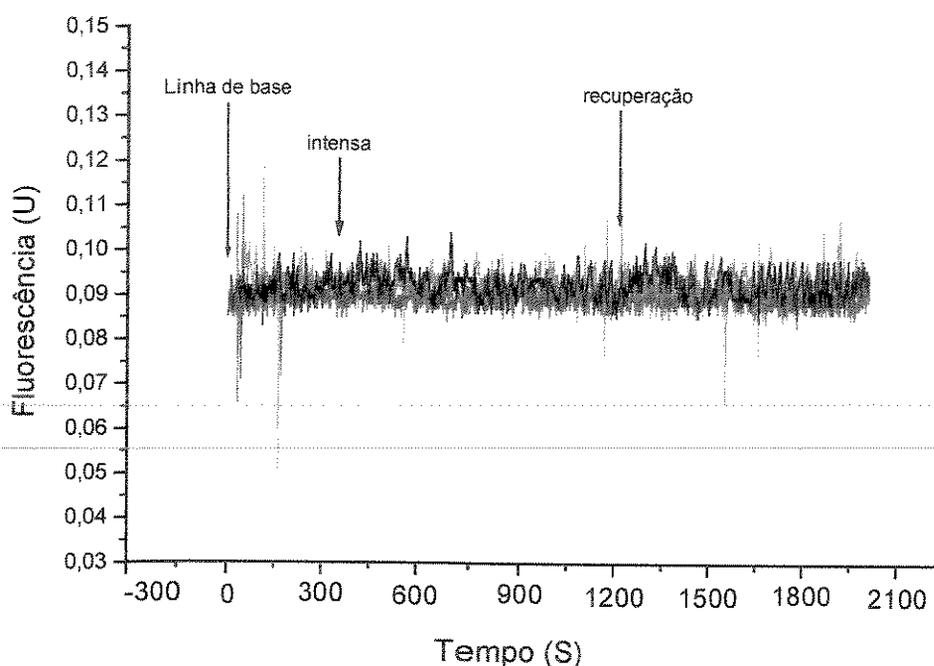


Figura 23: Efeito da GSH (0,5 mM)-PX (5 U.ml⁻¹) na oxidação do DCFH-BSA (10 μM) pelo H₂O₂ intersticial em combinação com a técnica de microdiálise em ratos durante contrações intensas. Os valores de fluorescência representam as concentrações de H₂O₂ no dialisado a uma taxa de fluxo de 0.1 μL.min⁻¹. Os dados representam 5 experimentos independentes.

9.6 - NÍVEIS DE FORÇA MUSCULAR DURANTE A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:

Os resultados do experimento exibido na tabela II mostram os valores de força média e máxima durante o protocolo de estimulação elétrica utilizado. Os valores de força máxima foram significativamente maiores comparados aos valores de força média ($P < 0,05$). Esses dados, comparados aos dados de literatura indicam que os músculos posteriores da perna do animal, incluindo o músculo gastrocnêmio foram fortemente estimulados como previamente demonstrado nos estudos de Wojtaszewski et. al. (1996).

Tabela II: Os valores são médias \pm D.P dos níveis de força média e máxima do membro inferior de ratos durante estimulação elétrica intensa.

Intensidade	No de experimentos	Força média (N/g)	Força máxima (N/g)
Intensa	05	$0,223 \pm 0,03$	$0,302 \pm 0,04 *$

* $P < 0,05$ comparado aos valores de força média.

10 – DISCUSSÃO:

Atualmente um dos maiores problemas no estudo envolvendo estresse oxidativo e exercício físico tem sido o estabelecimento de um método capaz de medir a formação de espécies reativas de oxigênio *in vivo*. Devido ao tempo de vida extremamente curto das EROs e a participação competitiva do sistema antioxidante essa tarefa tem se tornado um grande desafio aos pesquisadores na área. Embora alguns estudos tenham mostrado evidências da formação de EROs *in vivo* (Obata, 1997; Mcardle et. al., 2001), o nosso é o primeiro trabalho a mostrar a formação de H_2O_2 intersticial *in vivo* durante o exercício. Os resultados preliminares *in vitro* usando a sonda fluorescente DCFH-BSA combinada com a técnica de microdiálise mostraram que a intensidade de fluorescência do DCFH na presença de H_2O_2 é dose-dependente, indicando que esse modelo poderia ser usado com sucesso para determinação da concentração de H_2O_2 . A técnica de microdiálise tem sido atualmente muito utilizada no estudo das alterações de concentração de diferentes compostos metabólicos incluindo as EROs formadas pelas células musculares e presentes no meio extracelular. Essas espécies podem se difundir com muita facilidade para o interior da membrana de diálise reagindo com o marcador específico no líquido de perfusão. Em nosso caso, o DCFH-BSA foi usado como detector do H_2O_2 e devido ao alto peso molecular da molécula de BSA, este composto não pode difundir da membrana para o meio intersticial, podendo então ser analisado no líquido dialisado (Ryan et. al., 1990). Baseado nesse princípio nós exploramos o uso dessa metodologia para determinar a formação de H_2O_2 *in vivo* durante o exercício. Nossos resultados mostraram que as contrações musculares induzidas pela estimulação elétrica resultou em um aumento na intensidade de fluorescência do DCFH como mostra a alteração da inclinação das curvas de fluorescência exibidas na figura 21, quando comparado aos valores de linha de base. Os valores de fluorescência atingiram um platô ao término da estimulação elétrica, seguidos de uma tendência de declínio no final do período de recuperação. A especificidade do método na detecção do H_2O_2 foi confirmada pela completa remoção do sinal de fluorescência com a adição de GSH-PX na solução de perfusão (figura 23). Porém, como havia ocorrido nos experimentos *in vitro* usando culturas primárias de células musculares, a adição de CAT, o mais específico antioxidante do H_2O_2 em organismos aeróbios, não foi capaz de inibir o

aumento na intensidade de fluorescência do DCFH (figura 22). Nossos resultados estão de acordo com os resultados em culturas de células, onde surpreendentemente a CAT não foi capaz de evitar a oxidação do DCFH pelo H_2O_2 no meio extracelular como fez o sistema GSH-PX. Esses achados estão de acordo com outros trabalhos usando o DCFH como detector do H_2O_2 os quais também falharam em mostrar o efeito antioxidante da CAT (Tatla et. al., 1999; Reyk et. al., 2001). Nossos resultados confirmam a eficiência do sistema GSH-PX como um potente antioxidante em células musculares (Reyk et. al., 2001) e uma possível explicação para esse menor efeito antioxidante da CAT seria a diferença na afinidade dessas enzimas para o H_2O_2 . Para testar essa hipótese nós verificamos o efeito da CAT e GPX na oxidação do DCFH na ausência de células e na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 . Os resultados apresentados na tabela I confirmaram nossos achados *in vivo* mostrando que para baixas concentrações de H_2O_2 como ocorre em condições fisiológicas, o efeito da GSH-PX na degradação do H_2O_2 é maior. Ao contrário, para altas concentrações de H_2O_2 , ou de doses supra-fisiológicas o efeito antioxidante da CAT é mais eficiente comparado ao da GSH-PX (Chance et. al., 1979). Então, levando-se em conta que a concentração de H_2O_2 formado em condições fisiológicas é estimada para ser da ordem de 10^{-9} - 10^{-7} M (Oshino et. al., 1973) seria adequado admitir que nessas condições o efeito da GSH-PX será mais eficiente na remoção de H_2O_2 comparado ao da CAT.

O aumento na formação de H_2O_2 extracelular com o exercício sugere claramente um desequilíbrio no estado redox intracelular do músculo gastrocnêmio, no qual a membrana de microdiálise foi inserida. Esse músculo exibe um alto potencial oxidativo e uma capacidade antioxidante extremamente baixa comparada ao músculo sóleo predominantemente composto de fibras do tipo I (Hammeren et. al., 1992; Criswell et. al., 1993; Powers et. al., 1994; Atalay et. al., 1996). Então, é muito provável que o aumento do H_2O_2 intersticial durante o exercício seja explicado por essa desfavorável razão oxidativa/antioxidante do músculo gastrocnêmio, indicando que o sistema antioxidante não foi capaz de neutralizar o aumento da formação de EROs intracelular. Dessa forma, grande parte do H_2O_2 formado poderia estar sendo eliminado pela simples difusão para o meio extracelular (Chance et. al., 1979; Gohil et. al. 1988). Esse mecanismo, portanto, parece exercer um importante papel de defesa antioxidante, pelo menos em tecidos com baixos níveis de CAT e GPX como é o caso do tecido muscular (Chance et. al., 1979). Estes

achados estão de acordo com outros estudos *in vitro* os quais também tem mostrado evidências da ocorrência de estresse oxidativo durante o exercício em células musculares (Davies, et. al. 1982; Jackson et. al., 1985; Ji et. al., 1992, Diaz et. al., 1993; Kolbeck et. al., 1997).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que: 1) As contrações musculares induzidas aumentam a formação do H_2O_2 intersticial. 2) O uso do DCFH-BSA em combinação com a técnica de microdiálise constitui um atrativo método para a determinação do H_2O_2 intersticial durante o exercício *in vivo*. 3) Em células musculares a GPX tem um maior efeito antioxidante na remoção do H_2O_2 comparado a CAT.

11 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot -}$ *IN VITRO*:

11.1 - DETERMINAÇÃO DO RADICAL $O_2^{\cdot -}$ *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE CÉLULAS:

A figura 24 exhibe a curva padrão entre a intensidade de fluorescência do nitróxido reduzido e diferentes concentrações do radical superóxido gerado pelo sistema XA/XO. Os aumentos na intensidade de fluorescência foram dependentes dos aumentos na formação do superóxido com um valor de $r = 0,96$ e $p < 0,002$ como mostra o gráfico de linearidade no canto superior esquerdo.

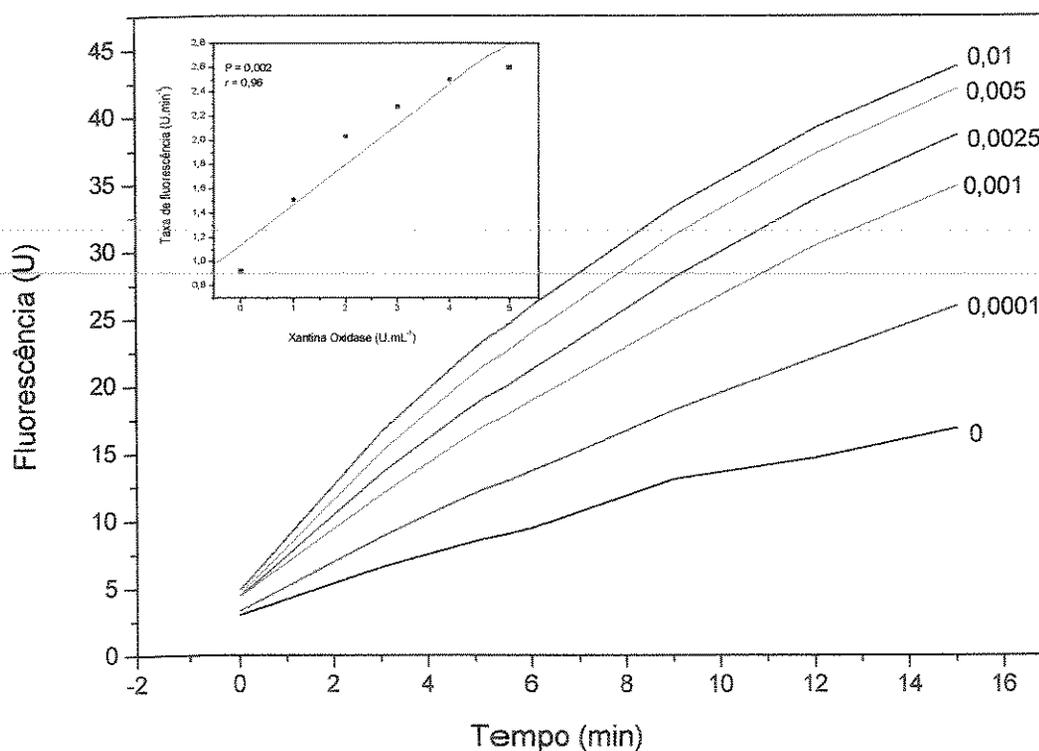


Figura 24: Efeito do superóxido gerado pelo sistema XA/XO na intensidade de emissão de fluorescência do nitróxido. O ensaio foi realizado em 1,5 mL de tampão KH_2PO_4 (0,05 M) e pH 7,4 contendo EDTA 10^{-4} M. A reação de mistura conteve nitróxido (50 μ M), xantina (400 μ M), cisteína (200 μ M) e xantina oxidase em 5 diferentes concentrações (0,0001; 0,001; 0,0025; 0,005 e 0,01 U.mL⁻¹).

11.2 - EFEITO DE DIFERENTES EROs NA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DO NITRÓXIDO:

Está demonstrado nos experimentos exibidos na figura 25 que o nitróxido é reduzido à sua correspondente hidroxilamina pelo radical $O_2^{\cdot-}$ na presença de cisteína. A adição de cisteína (200 μM) ao sistema XA/XO na presença de nitróxido aumentou em 166% a intensidade de fluorescência ($P < 0,05$). A adição de SOD inibiu o aumento na intensidade de fluorescência mantendo o sinal próximo aos valores do controle. A adição de CAT como sequestrador do H_2O_2 não induziu nenhuma alteração no sinal de fluorescência comparado ao grupo cisteína ($P > 0,05$). Nós ainda exploramos a capacidade do nitróxido na detecção do radical $\cdot OH$ gerado pela reação de Haber-Weiss pela adição de Fe^{2+} . Porém, nenhum aumento na intensidade de fluorescência foi verificado, descartando a possibilidade de detecção do radical $\cdot OH$ pelo nitróxido ($P > 0,05$ comparado ao controle).

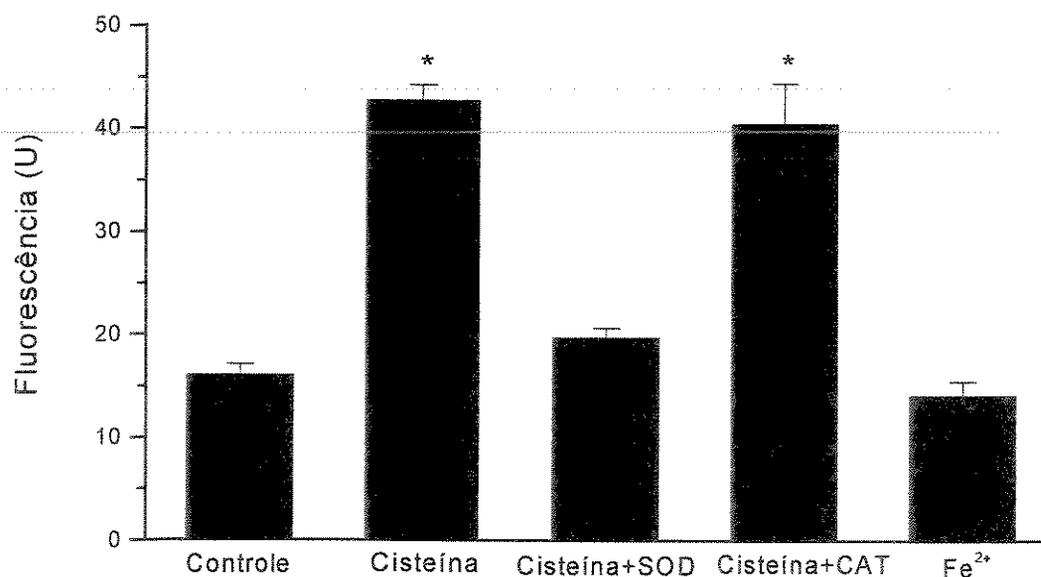


Figura 25: Efeito do $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e do radical $\cdot OH$ na intensidade de fluorescência do nitróxido em meio livre de células. As EROs $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 foram geradas pelo sistema XA (400 μM)/XO (0,01 U.mL⁻¹). A geração do $\cdot OH$ ocorreu nas mesmas condições, exceto na adição de Fe^{2+} . Os experimentos foram realizados em 1,5 mL de tampão KH_2PO_4 (0,05 M), pH 7,4 contendo EDTA 10^{-4} M e nitróxido (50 μM). Em experimentos independentes cisteína (200 μM), cisteína + SOD (30 U.mL⁻¹), cisteína + CAT (300 U.mL⁻¹) e Fe^{2+} (50 μM) foram adicionados. Os valores são médias \pm S.E e * $P < 0,05$ comparado ao controle.

11.3 - DETERMINAÇÃO EXTRACELULAR DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ EM NEUTRÓFILOS ISOLADOS:

Considerando a baixa produção intracelular de EROs e a presença competitiva do sistema antioxidante, nós inicialmente exploramos a utilização do nitróxido em condições fisiológicas na presença de neutrófilos, um sítio já conhecido de produção e liberação extracelular do $O_2^{\cdot-}$. O experimento controle com neutrófilos mostrou que o nitróxido tem uma boa sensibilidade na detecção do $O_2^{\cdot-}$ no meio extracelular. A especificidade pelo $O_2^{\cdot-}$ foi demonstrada pelo efeito inibitório da SOD na intensidade de fluorescência. A intensidade de fluorescência do nitróxido aumentou em 63 % quando os neutrófilos foram estimulados com PMA. SOD (30 U.mL^{-1}) reduziu a intensidade de fluorescência para os valores basais do grupo controle, enquanto a CAT não teve qualquer efeito ($P > 0,05$ comparado ao grupo controle).

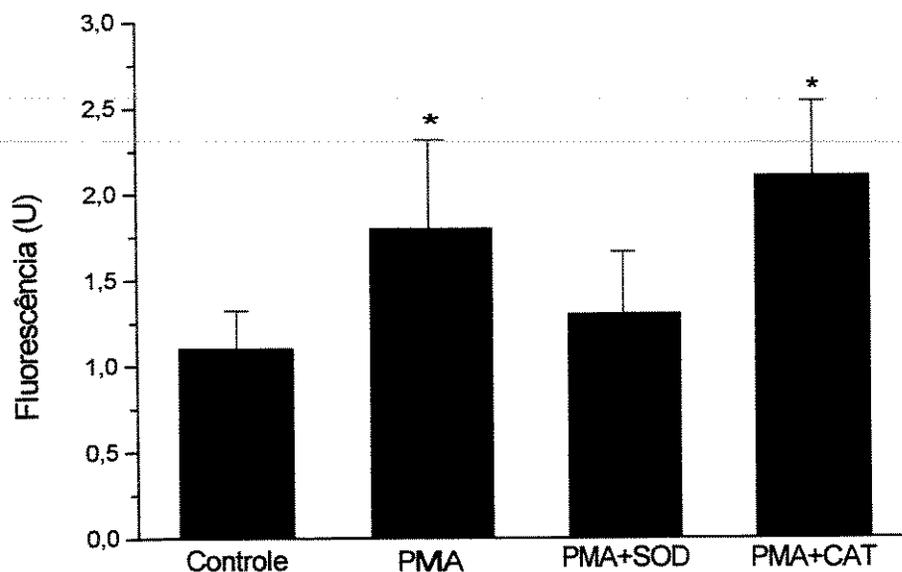


Figura 26: Efeito do radical $O_2^{\cdot-}$ gerado por neutrófilos estimulados na intensidade de emissão de fluorescência do nitróxido. O ensaio foi realizado em 1,5 mL de solução tampão HBSS contendo neutrófilos (10^4 cel.mL^{-1}), DPTA 0,1 mM e pH 7,4. A reação de mistura continha PMA (100 ng.mL^{-1}), nitróxido ($50 \text{ }\mu\text{M}$) e cisteína ($200 \text{ }\mu\text{M}$). Em experimentos independentes SOD (30 U.mL^{-1}) foi usada como sequestrador extracelular do radical superóxido e CAT foi adicionada como sequestrador do H_2O_2 . Os valores são médias \pm S.E e * $P < 0,05$ comparado ao controle.

11.4 – LIBERAÇÃO EXTRACELULAR DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ EM CULTURAS DE CÉLULAS MUSCULARES:

Este experimento foi realizado para verificar o efeito das contrações induzidas por 10 min de estimulação elétrica na liberação de superóxido para o meio extracelular em culturas de células musculares. As contrações induziram um aumento significativo de 43,3% na intensidade de fluorescência do nitróxido quando o grupo controle foi comparado ao grupo estimulado ($P < 0,05$). A adição de SOD inibiu o aumento na intensidade de fluorescência do nitróxido no grupo estimulado ($P < 0,05$) com nenhum efeito no grupo controle.

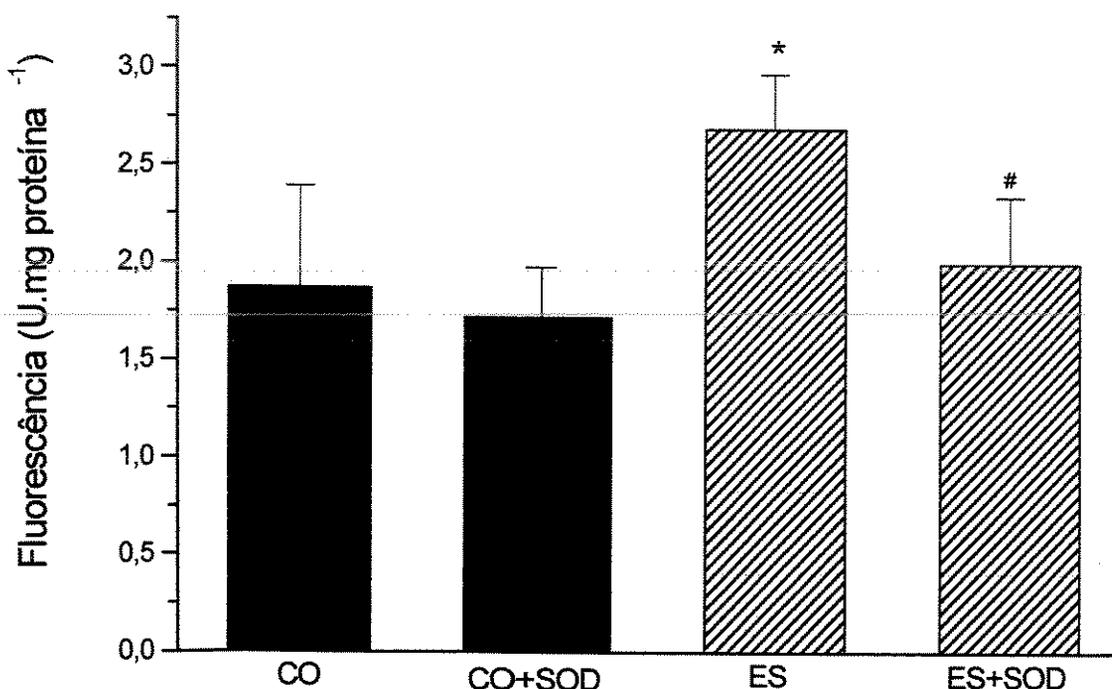


Figura 27: Efeito da estimulação elétrica intensa na liberação extracelular do superóxido em culturas de células musculares. As culturas foram divididas em 2 grupos: controle (CO) e estimulado (ES). O ensaio foi realizado em 2,5 mL de Krebs Ringer, contendo nitróxido (50 μ M), cisteína (200 μ M), pH 7,4 e temperatura de 37° C. Em experimentos independentes SOD (30 U.mL⁻¹) foi usada como sequestrador extracelular do radical superóxido. Os valores são médias \pm S.E, * $P < 0,05$ comparado ao controle e # $P < 0,05$ comparado ao ES.

11.5 – LIBERAÇÃO EXTRACELULAR DO RADICAL $O_2^{\cdot-}$ EM MÚSCULO ESQUELÉTICO ISOLADO:

A figura 28 mostra o efeito das contrações induzidas por estimulação elétrica durante 10 min na liberação de superóxido para o meio extracelular em músculo sóleo e EDL. O protocolo de estimulação elétrica utilizado induziu um aumento significativo na intensidade de fluorescência do nitróxido no grupo estimulado em 26,6 e 57% para os músculos sóleo e EDL, respectivamente ($P < 0,05$). A adição de SOD no grupo estimulado inibiu o aumento na intensidade de fluorescência do nitróxido ($P < 0,05$ comparado ao grupo estimulado), ao passo que a adição de SOD no grupo controle, não teve nenhum efeito na intensidade de fluorescência do nitróxido ($P > 0,05$ comparado ao controle).

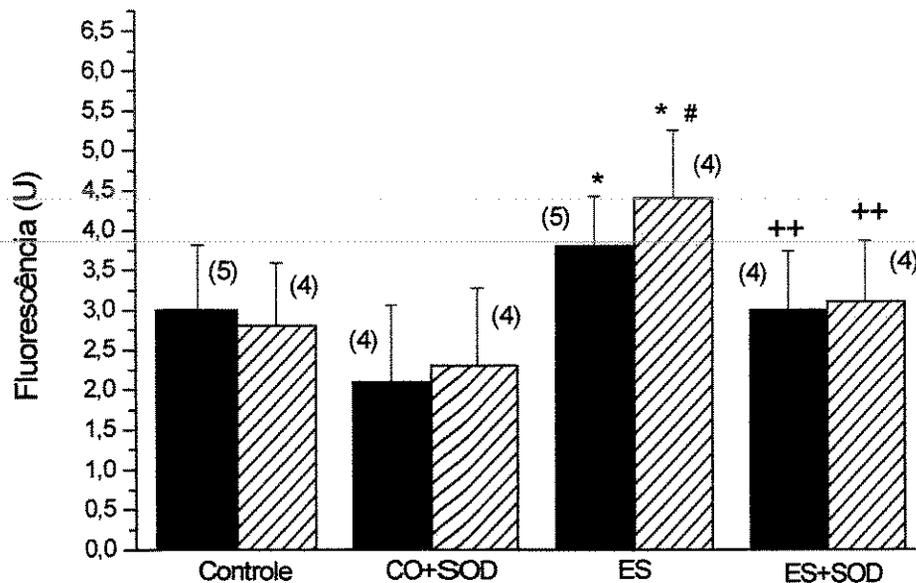


Figura 28: Efeito da estimulação elétrica intensa na liberação extracelular do superóxido em músculo sóleo (barra em negrito) e músculo EDL (barra hachurada). Os grupos experimentais foram designados como músculos controles (CO), controles + SOD (CO+SOD), estimulados (ES) e estimulados + SOD (ES+SOD). Os experimentos foram realizados em 2,5 mL de Krebs Ringer, contendo nitróxido (50 μ M), cisteína (200 μ M), pH 7,4 e temperatura de 37° C. SOD (30 U.mL⁻¹) foi usada como sequestrador extracelular do radical superóxido. Os valores são médias \pm S.E. (*) $P < 0,05$ comparado ao controle, (#) $P < 0,05$ comparado ao músculo sóleo ES e (++) $P < 0,05$ comparado ao grupo ES. Os números em parênteses indicam o número de experimentos.

11.6 - NÍVEIS DE FORÇA MUSCULAR DURANTE A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA:

Os resultados do experimento exibido na tabela III mostraram que o músculo EDL exibiu níveis significativamente mais altos de força média e máxima (sem antioxidante) comparado ao músculo sóleo ($P < 0,05$).

Tabela III: Níveis de força média e máxima entre os músculos sóleo e EDL submetidos a contrações.

Músculo	Nº experimentos	Força média (N/g)	Força máxima (N/g)
Sóleo estimulado	05	$0,052 \pm 0,03$	$0,073 \pm 0,1$
Sóleo estimulado + SOD	04	$0,04 \pm 0,01$	$0,078 \pm 0,3$
EDL estimulado	04	$0,071 \pm 0,02 *$	$0,085 \pm 0,2 *$
EDL estimulado + SOD	04	$0,072 \pm 0,01*$	$0,086 \pm 0,2$

Valores de força produzidos pelos músculos sóleo e EDL em contrações durante 10 min de estimulação elétrica. Os valores estão expressados como média \pm DP em Newtons por grama. * $P < 0,05$ comparado ao músculo sóleo estimulado.

12 - DISCUSSÃO:

Nossos achados em células musculares confirmaram os achados anteriores de Lynch & Fridovich (1978) em hemácias, mostrando que o $O_2^{\cdot-}$ eventualmente produzido no meio intracelular pode alcançar o meio extracelular. Os resultados em culturas de células musculares mostraram que as contrações provocadas pelo protocolo de estimulação elétrica induziram um aumento de 43,3% na intensidade de fluorescência do nitróxido. A adição de SOD ao grupo estimulado inibiu a intensidade de fluorescência para os valores basais do controle, ao passo que no grupo controle, a adição de SOD não exerceu nenhum efeito significativo, indicando que a liberação basal do $O_2^{\cdot-}$ deva ser negligenciável ou estar muito abaixo dos limites de detecção do nitróxido. O efeito antioxidante da SOD reduzindo o sinal de fluorescência no grupo estimulado confirma o aumento do efluxo do $O_2^{\cdot-}$ para o meio extracelular. Por ser esta enzima uma proteína de alto peso molecular é esperado que sua ação seja limitada somente ao espaço extracelular, o mesmo acontecendo com o nitróxido, que por ser um composto polar, também deve permanecer no meio extracelular, com nenhuma ou apenas baixa infiltração intracelular. Esses resultados, então, confirmam o aumento do $O_2^{\cdot-}$ no meio extracelular em células musculares após estimulação, provavelmente em razão do seu aumento no meio intracelular. Em experimentos com músculo isolado, os músculos sóleo e EDL após estimulação elétrica exibiram um aumento na intensidade de fluorescência de 26 e 57% respectivamente, ao passo que a adição de SOD inibiu o aumento na intensidade de fluorescência do nitróxido em ambos os músculos (figura 28). O aumento na intensidade de fluorescência do nitróxido no músculo EDL estimulado foi de 15,7% maior que no músculo sóleo. Em ratos Wistars estes músculos são compostos de fibras do tipo I (oxidativas) e IIa,b (oxidativas-glicolíticas) respectivamente. Porém, o músculo do tipo IIa parece exibir um potencial oxidativo maior ou similar e uma menor capacidade antioxidante comparado aos músculos do tipo I (Laughlin et. al., 1990; Hammeren et. al., 1992; Powers et. al. 1994; Atalay et. al. 1995; Hollander et. al. 1999). Então essa razão capacidade oxidativa/capacidade antioxidante desfavorável poderia explicar a maior liberação extracelular do $O_2^{\cdot-}$ no músculo EDL. Em outras palavras, a alta capacidade de consumir O_2 e o baixo potencial antioxidante favorecerá sempre uma maior ocorrência de estresse oxidativo no músculo tipo IIa quando comparado aos músculos tipo

I. Em adição, o músculo EDL apresentou um maior nível de força máxima e média comparado ao músculo sóleo (tabela III). Porém, nossos resultados ainda não confirmam se o maior nível de força do músculo EDL pode ter contribuído para uma maior formação de EROs. A adição de SOD não causou nenhum efeito significativo nos níveis de força. Então, com base nesses achados, seria possível especular que o maior nível de força produzido pelo EDL tivesse induzido a uma maior produção de EROs. Alguns estudos com músculos isolados intactos tem mostrado que o balanço redox intracelular pode ter uma importante influência nas funções celulares (Reid et. al., 1993; Oba et. al., 1996). Oba et. al. (1996) demonstraram em músculos diafragma que uma breve exposição ao H_2O_2 aumentou a força e o tempo de contração muscular, ao passo que a adição de CAT teve o efeito oposto, reduzindo os níveis de força e o tempo de contração.

O aumento desproporcional nos valores de fluorescência entre os resultados em músculo isolado e culturas de células pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos diferentes sítios de produção do $O_2^{\cdot-}$ que podem ser encontrados em músculo isolado, como a XO, a presença de hemácias e neutrófilos no endotélio capilar e o maior número de células presentes em músculo isolado quando comparado às nossas culturas de células. Esses resultados juntos indicam que algum cuidado deve ser tomado na interpretação dos resultados em modelos experimentais onde as células musculares não podem ser completamente isoladas, como nos experimentos em músculos isolados ou em estudos *in vivo*. Nessas condições, outras fontes geradoras de $O_2^{\cdot-}$ como as citadas acima, podem estar presentes, interferindo na análise final dos resultados.

Embora nossos resultados não confirmem, a fonte subcelular de produção do $O_2^{\cdot-}$ tem sido descrita como sendo a mitocôndria (Boveris & Chance 1973; Chance et. al., 1979). Considerando que o tempo de vida estimado do $O_2^{\cdot-}$ é de 1×10^{-6} s, seria difícil acreditar na hipótese dessa espécie ser produzida na mitocôndria e alcançar o meio extracelular. E a primeira questão que surge é como isso seria possível? Uma hipótese seria que o $O_2^{\cdot-}$, sendo considerado um fraco oxidante em meio aquoso, atravessaria a membrana celular explicando o seu efluxo para o meio extracelular (Lynch & Fridovich, 1978; Fridovich, 1986; Yu, 1994). Essa espécie pode utilizar como via de acesso extracelular os canais iônicos presentes nas membranas celulares, como demonstrado através de bloqueadores específicos destes canais (Lynch & Fridovich, 1978). No

experimento controle utilizando neutrófilos e exibido na figura 26 foi verificado que essas células podem facilmente aumentar a liberação extracelular do $O_2^{\cdot-}$ quando estimuladas. Esse mecanismo conhecido como “burst” oxidativo ocorre via NADPH oxidase, uma enzima de membrana capaz de liberar para o meio extracelular grandes quantidades de elétrons reduzindo univalentemente o O_2 no meio extracelular ao radical $O_2^{\cdot-}$ (Bass et. al., 1983). Embora esse mecanismo ainda esteja estabelecido somente em neutrófilos, alguns autores sugerem a possibilidade de sua existência também em células musculares (Reid et. al., 1992). Outra possibilidade na explicação do efluxo aumentado do $O_2^{\cdot-}$ seria a localização sub-sarcolemal das mitocôndrias em células musculares. Essa proximidade morfológica entre as mitocôndrias e a membrana celular poderia facilitar esse efluxo, encurtando a distância a ser percorrida pelo $O_2^{\cdot-}$ até alcançar o meio extracelular (Hoppeler et. al., 1981). Com base nas possibilidades descritas acima em explicar os possíveis mecanismos de liberação extracelular do $O_2^{\cdot-}$, a segunda questão que surge é qual seria a importância fisiológica desse mecanismo? Na verdade, a importância fisiológica desse mecanismo ainda não foi descrita na literatura, mas certamente podemos sugerir que este efluxo aumentado do $O_2^{\cdot-}$ poderia estar funcionando como um importante mecanismo antioxidante, contribuindo para a redução no acúmulo de EROs no meio intracelular, e assim evitando o aumento de oxidações em diversos compostos intracelulares (Freeman & Crapo, 1982; Reid et. al., 1992; Reid et al., 1993; Andrade et. al., 1998).

Portanto, nossos resultados mostraram que: (1) O radical $O_2^{\cdot-}$ é amplamente produzido pelas células musculares submetidas a contrações e parte desse $O_2^{\cdot-}$ produzido pode alcançar o meio extracelular. (2) A liberação extracelular do $O_2^{\cdot-}$ é maior no músculo sóleo (tipo I) comparado com músculo EDL (tipo IIa). (3) O composto fluorescente nítróxido é uma sonda sensível e altamente específica para detecção do radical $O_2^{\cdot-}$, portanto, indicada para estudos em condições fisiológicas. (4) O aumento do efluxo extracelular do $O_2^{\cdot-}$ durante as contrações pode constituir um importante mecanismo de defesa antioxidante, contribuindo para redução do acúmulo do $O_2^{\cdot-}$ e evitando a formação de outras EROs no meio intracelular.

13 – CONCLUSÃO GERAL:

Nossos resultados em culturas de células musculares livres de tecido vascular proporcionam evidências diretas de que as células musculares são importantes sítios de produção de NO, H₂O₂ e O₂^{•-} durante contrações.

14 – CONCLUSÕES ESPECÍFICAS:

DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ E NO EM CULTURAS DE CÉLULAS:

1 - A alta permeabilidade da membrana da célula muscular ao H₂O₂ e NO como evidenciado pela detecção extracelular do NO e H₂O₂, constitui um importante mecanismo de defesa contra a formação intracelular do [•]OH e [•]ONOO.

2 - DCFH e DAF-2 são sensíveis a detecção de EROs e NO respectivamente, no meio intra e extracelular em culturas de células musculares. O H₂O₂ é o principal indutor de oxidação do DCFH em células musculares sob condições fisiológicas.

DETERMINAÇÃO DO O₂^{•-} EM CULTURA DE CÉLULA E MÚSCULO ISOLADO:

1- O O₂^{•-} produzido no meio intracelular de células durante contrações pode ser liberado para o meio extracelular, sendo essa liberação maior em músculo predominantemente oxidativo.

2 - A sonda fluorescente nitróxido é sensível e altamente específica para detecção do radical O₂^{•-} em condições fisiológicas.

DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ *IN VIVO*:

- 1 - As contrações musculares induzidas aumentam a formação do H₂O₂ intersticial.
- 2 - O uso do DCFH-BSA em combinação com a técnica de microdiálise constitui um atrativo método para a determinação do H₂O₂ intersticial durante o exercício *in vivo*.
- 3 - Em células musculares, a GPX tem um maior efeito antioxidante na remoção do H₂O₂ comparado a CAT.

15 - REFERÊNCIAS:

- AGHDASI, B.; REID, M. B.; HAMILTON, S. L. Nitric oxide protects the skeletal muscle Ca^{2+} release channel from oxidation induced activation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 25462-25467, 1997.
- AL-MEHDI, A. B.; SHUMAN, H.; FISHER, A. B. Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *American Journal Physiology*, v. 272, p. L294-L300, 1997.
- AMBERG, G.; LINDEFORS, N. Intracerebral microdialysis: II. Mathematical studies of diffusion kinetics. *Journal of Pharmacology Methods*, v. 22, p. 157-183, 1989.
- ANDRADE, F. H.; MOODY, M. R.; STAMLER, J. S.; REID, M. B. Cytochrome c reduction assay detects nitric oxide release by rat diaphragm. In: *The Biology of Nitric Oxide*, part 5, S. Moncada, J. Stamler, S. Gross, and E. Higgs (Eds). London: Portland Press, 1996, pp. 45.
- ANDRADE, F. H.; REID, M. B.; ALLEN, D. G.; WESTERBLAD, H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *Journal of Physiology*, v. 509(2), p. 565-575, 1998.
- ARNER, P.; BOLINDER, J. Microdialysis of adipose tissue. *Journal of International Medicine*, v. 230, p. 381-386, 1991.
- ARUOMA, O.; HALLIWELL, B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radical from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochemistry Journal*, v. 241, p. 273-278, 1987.

- ATALAY, M.; SEENE, T.; HANNINEN, O.; SEM, C. K. Skeletal muscle and heart antioxidant defence in response to sprint training. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 158, p. 129 – 134, 1995.
- BALON, T. W.; NADLER, J. L. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *Journal of Applied Physiology*, v. 77(6), p. 2519 – 2521, 1994.
- BANGSBO, J. Muscle oxygen uptake in human at onset of and during intense exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 168, p. 457-464, 2000.
- BARROW, S. E.; DOLLERY, C. T.; HEAVEY, D. J.; HICKLING, N. E.; RITTER, J. M.; MIAL, J. Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man. *British Journal of Pharmacology*, v. 87, p. 243 – 247, 1986.
- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *Journal of Immunology*, v. 130(4), p. 1910–1917, 1983.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BOCZKOWSKI, J., LANONE, S., LONGROIS, U., DANIALOU, G., FOURNIER, T.; AUBIER, M. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin, administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. *Journal of Chemistry Investigation*, v. 98, p. 1550-1557, 1996.

- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemistry Journal*, v. 134, p. 707-716, 1973.
- BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal*, v. 128, p. 617-630, 1972.
- BOYM, A. Separation of white blood cells. *Nature*, v. 204, p. 793-798, 1964.
- BOYM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical Investigation*, v. 21(Suppl.97), 1966.
- BREDT, D. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radical Research*, v. 31, p. 577-596, 1999.
- BUDD, S. L.; CASTILHO, R. F.; NICHOLLS, D. G. Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Letters*, v. 415, p. 21-24, 1997.
- BUROW, S.; VALET, G. Flow-cytometric characterization of stimulation, free radical formation, peroxidase activity and phagocytosis of human granulocytes with 2,7-dichlorofluorescein (DCF). *European Journal of Cell Biology*, v. 43, p. 128 – 133, 1987.
- CARTER, W. O.; NARAYANAN, P. K.; ROBINSON, J. P. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 5, p. 253 – 258, 1994.
- CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B. N. Detection of picomoles levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry*, v. 134, p. 111 – 116, 1983.

- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, v. 59(3), p. 527 – 605, 1979.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, v. 17, p. 65-134, 1956.
- CLANTON, T. L.; ZUO, LI; KLAWITTER, P. Oxidants and skeletal muscle function: Physiologic and pathophysiologic implications. *Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine*, v. 222, p. 253 – 262, 1999.
- CLEETER, M. W.; COOPER, J. M.; DARLEY-USMAR, V. M.; MONCADA, S.; SCHAPIRA, A. H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Letters*, v. 345, p. 50-54, 1994.
- CORCONDILAS, A.; KORO Xenidis, G. T.; SHEPHERD, J. T. Effect of brief contraction of forearm muscle on forearm blood flow. *Journal of Applied Physiology*, v. 19, p. 142-147, 1964.
- CRISWELL, D.; POWERS, S. DODD, S.; LAWLER, J.; EDWARDS, W. RENSHLER, K.; GRINTON, S. High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Medicine and Science in Sports and Medicine*, v. 25(10), p. 1136 – 1140, 1993.
- DAVIES, K. J. A. Proteolytic system as secondary antioxidant defenses. In: *Cellular Antioxidant Defenses Mechanisms*, edited by C. K. Chow. Boca Raton, FL: CRC, 1988, p. 25-67.
- DAVIES, K.J. A.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v. 107, p. 1198 – 1205, 1982.

- DAVIS, J. A.; VODAK, P.; WILMORE, J. H.; VODAK, J.; KURTZ, P. Anaerobic threshold and maximal aerobic power for three modes of exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 41(4), p. 544 – 550, 1976.
- DIAZ, P.T.; SHE, Z-W.; DAVIS, W.B.; CLANTON, T.L. Hydroxylation of salicylate by the *in vitro* diaphragm: evidence for hydroxyl radical production during fatigue. *Journal of Applied Physiology*, v. 75, p. 540 – 545, 1993.
- DOWNEY, J. M. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annual Review of Physiology*, v. 52, p. 487-504, 1990.
- ERNSTER, L. Oxygen as an environmental poison. *Chemistry Scripta*, v. 26, p. 525-534, 1986.
- FINKELSTEIN, E.; ROSEN, G. M.; RAUCKMAN, E. J. Superoxide dependent reduction of nitroxides by thiols. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 802, p. 90-98, 1984.
-
- FRANSEN, U.; LOPEZ-FIGUEROA, M. O.; HELLSTEN, Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 227, p. 88-93, 1996.
- FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radical and tissue injury. *Laboratory Investigation*, v. 47, p. 412-416, 1982.
- FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 247(1), p. 1-11, 1986.
- FUJII, Y.; GUO, Y.; HUSSAIN, S. N. A. Regulation of nitric oxide production in response to skeletal muscle activation. *Journal of Applied Physiology*, v. 85(6), p. 2330-2336, 1998.

- GALLER, S.; HILBER, K.; GOBESBERGER, A. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pfleugers Archives*, v. 434, p. 242-245, 1997.
- GODIN, D. V.; WOHAIEB, S. A. Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status. *Free Radical in Biology and Medicine*, v. 5, p. 165-176, 1988.
- GOHIL, K.; VIGUIE, C.; STANLEY, W. C.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Blood glutathione oxidation during human exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 64(1), p. 115-119, 1988.
- GOSS, S. P. A.; SINGH, R. J.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Reaction of NO[•], NO₂[•] and Peroxynitrite in membranes: Physiological implications. *Free Radical Research*, v. 31, p. 597 – 606, 1999.
- GREENSTOCK, C. L.; MILLER, R. W. The oxidation of iron by superoxide anion kinetics of the reaction in aqueous solution and in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 396, p. 11 – 16, 1975.
- GROSS, W. L.; BAK, M. I.; INGWALL, J. S. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 93, p. 5604-5609, 1996.
- GUNASEKAR, P. G.; KANTHASAMY, A. G.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Monitoring intracellular nitric oxide formation by dichlorofluorescein in neuronal cells. *Journal Neuroscience Methods*, v. 61, p. 15 – 21, 1995.
- HABER, F.; WEISS, J. J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of Royal Society of London*, v. 147, p. 332-351, 1934.
- HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*, v. 44 (1), p. 6-13, 1996.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species, In: *Free radicals in Biology and Medicine*. Ed. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge. Oxford: Clarendon Press, p. 136 – 158, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B.; KAUR, H. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assay for hydroxyl radicals: a cautionary note visited for the third time. *Free Radical Research*, v. 27(3), p. 239 – 244, 1997.
- HAMBERGER, A. Microdialysis in clinical diagnosis: amino acid patterns in the temporal cortex and the myocardium. *Current Separations*, v. 9, p. 119- 124, 1989.
- HAMMEREN, J.; POWERS, S.; LAWLER, J.; CRISWELL, D.; MARTIN, D.; POLLOCK, M. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. *International Journal of Sports and Medicine*, v. 13, p. 412 –416, 1992.
- HELLSTEN, Y.; FRANDSEN, U. Adenosine formation in contracting primary rat skeletal muscle cells and endothelial cells in culture. *Journal of Physiology*, v. 504(3), p. 695-704, 1997.
- HOLLANDER, J.; FIEBIG, R.; GORE, M.; BEJMA, J.; OOKAWARA, T.; OHNO, H.; JI, L. L. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *American Journal Physiology*, v. 277, p. R856-R862, 1999.
- HOPPELER, H.; MATHIEU, O.; KRAUER, R.; CLAASSEN, H.; ARMSTRONG, R. B.; WEIBEL, E. R. Design of the mammalian respiratory system. VI. Distribution of mitochondria and capillaries in various muscles. *Respiration Physiology*, v. 44, p. 87-111, 1981.

- JACKSON, M. J. ; EDWARDS, R. H. T.; SYMONS, M. C. R. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 847, p. 185 – 190, 1985.
- JENKINS, R. R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *American Journal clinical Nutrition*, v. 72, p. 670S – 674S, 2000.
- Ji, LI LI. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 222, p. 283 – 292, 1999.
- Ji, L. L.; FU, R. ; MITCHELL, E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber and exercise intensity. *Journal of Applied Physiology*, v. 73(5), p. 1854 – 1859, 1992.
- KEHRER, J. P.; PARADATHATHU, T. The use of fluorescent probes to assess oxidative processes in isolated-perfused rat heart tissue. *Free Radical Research Communication*, v. 16(4), p. 217 – 225, 1992.
-
- KESTON, A. S. ; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, v. 11, p. 1-5, 1965.
- KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochemistry Journal*, v. 298, p. 249-258, 1994.
- KOBZIK, L.; REID, M. B.; BREDET, D. S.; STAMLER, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, v. 372, p. 546 – 548, 1994.
- KOJIMA, H.; NAKATSUBO N.; KIKUCHI, K; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicator: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, v. 70, p. 2446 – 2453, 1998.

- KOLBECK, R. C.; SHE, Z.W.; CALLAHAN, L. A.; NOSEK, T. M. Increased superoxide production during fatigue in the perfused rat diaphragm. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 156, p. 140 – 145, 1997.
- KOOY, N. W.; ROYALL, J. A.; ISCHIROPOULOS, H. Oxidation of 2',7'-Dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radical Research*, v. 27(3), p. 245 – 254, 1997.
- KUEHL, F. A. J.; EGAN, R. W. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science*, v. 210, p. 978-984, 1980.
- LAUGHLIN, M. H.; SIMPSON, T. SEXTON, W. L.; BROWN, O. R.; SMITH, J. K.; KORTHUIS, R. J. Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *Journal of Applied Physiology*, v. 68(6), p. 2337-2343, 1990.
- LeBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. Evaluation of the probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research Toxicology*, v. 5, p. 227 – 231, 1992.
- LONNROTH, P. Microdialysis a new and promising method in clinical medicine. *Journal of International Medicine*, v. 230, p. 363-364, 1991.
- LONNROTH, P.; SMITH, U. Microdialysis – A novel technique for clinical investigation. *Journal of International Medicine*, v. 227, p. 295–300, 1990.
- LÓPEZ-FIGUEROA, M. O.; CAAMAÑO, C.; MORANO, M. I.; RONN, L. C.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 272; p. 129-133, 2000.
- LYNCH, R. E.; FRIDOVICH, I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 4697-4699, 1978.

LYNGE J, JUEL C, HELLSTEN Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. *Journal of Physiology*, v. 537, p. 597-605, 2001.

MACLEAN, D. A.; BANGSBO, J.; SALTIN, B. Muscle interstitial glucose and lactate levels during dynamic exercise in humans determined by microdialysis. *Journal of Applied Physiology*, v. 87(4), p. 1483 – 1490, 1999.

MAGGS, D. G., JACOB, R., RIFE, F., LANGE, F., LEONE, P., DURING, M. J., TAMBORLANE, W. V.; SHERWIN, R. S. Interstitial fluid concentrations of glycerol, glucose and amino acids in human quadriceps muscle and adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, v. 96, p. 370-377, 1995.

McALLISTER, R. M; HIRAI, T.; MUSCH, T. I. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 27, p. 1145-1151, 1995.

McARDLE, A.; PATTWELL, D.; VASILAKI, A.; GRIFFITHS, R. D.; JACKSON, M. J. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive response. *American Journal of Physiology*, v. 280, p. C621 – C627, 2001.

McCORD, J. M. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, v. 185, p. 529-530, 1974.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 243, p. 5753-5760, 1968.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 244(22), p. 6049-6055, 1969.

- MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*. V. 5(28). P. 57 – 62, 1987.
- MEYDANI, M.; EVANS, W. J. Free radicals, exercise, and aging. In: Yu, BP, Ed. *Free Radical in Aging*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 183 – 204, 1993.
- MOHR, S.; STAMLER, J. S.; BRUNE, B. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 4209-4214, 1996.
- MOMBOULI, J. V.; ILLIANO, S.; NAGAO, T.; SCOTT-BURDEN, T.; VANHOUTTE, P. M. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circulation Research*, v. 71, p. 137 – 144, 1992.
- MURRANT, C. L.; ANDRADE, F. H.; REID, M. B. Exogenous reactive oxygen and nitric oxide alter intracellular oxidant status of skeletal muscle fibres. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 166, p. 111 – 121, 1999.
- NAKANE, M.; SCHMIDT, H.H.H.; POLLOCK, J. S.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Letters*, v. 316, p. 175-180, 1993.
- NAKATSUBO, N.; KOJIMA, H.; KIKUCHI, K.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y. MAEDA, D.; IMAI, Y.; IRIMURA, T.; NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Letters*, v. 427, p. 263-266, 1998.
- OBA, T.; KOSHITA, M.; YAMAGUCHI, M. H₂O₂ modulates twitch tension and increases P₀ of Ca²⁺ release channel in frog skeletal muscle. *American Journal Physiology*, v. 271, p. C810-818, 1996.

OBATA, T. Use of microdialysis for *in-vivo* monitoring of hydroxyl free-radical generation in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 49, p. 724 – 730, 1997.

O'NEILL, C. A.; STEBBINS, C. L.; BONIGUT, S.; HALLIWELL, B.; LONGHURST, J. C. Production of hydroxyl radicals in contraction skeletal muscle of cats. *Journal of Applied Physiology*, v. 81(3), p. 1197 – 1206, 1996.

OSHINO, N.; CHANCE, B.; SIES, H.; BUCHER, T. The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 154, p. 117 – 131, 1973.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelium cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v. 333, p. 664-669, 1988.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-530, 1987.

PERKINS, W. J.; HAN, Y. S.; SIECK, G. C. Skeletal muscle force and acto myosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *Journal of Applied Physiology*, v. 83, p. 1326-1332, 1997.

POU, S.; HUANG, Y. I.; BHAN, A.; BHADTI, V. S.; HOSMANE, R. S.; WU, S. Y.; CAO, G. L.; ROSEN, G. M. A fluorophore-containing nitroxide as a probe to detect superoxide and hydroxyl radical generated by stimulated neutrophils. *Analytical Biochemistry*, v. 212, p. 85-90, 1993.

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L. L.; MARTIN, D.; HERB, R. A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal Physiology*, v. 266, p. R375 – R380, 1994.

- PRYOR, W. A. Oxy-radical and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annual Review of Physiology*, v. 48, p. 657-667, 1986.
- PYNE, D. B. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Medicine*, v. 17, p. 245-258, 1994.
- RAO, K. M. K.; PADMANABHAN, J.; KILBY, D. L.; COHEN, H. J.; CURRIE, M. S.; WEINBERG, J. B. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 51, p. 496 – 500, 1992.
- REID, M. B. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 33(3), p. 371-376, 2001.
- REID, M. B.; HAACK, K. E.; FRANCKEK, K. M.; VALBERG, P. A.; KOBZIK, L.; WEST, M. S. Reactive oxygen in skeletal muscle I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. *Journal of Applied Physiology*, v. 73(5), p. 1797 – 1804, 1992.
-
- REID, M. B.; KHAWLI, F. A.; MOODY, M. R. Reactive oxygen in skeletal muscle III. Contractility of infatigued muscle. *Journal of Applied Physiology*, v.75, p. 1081–1087, 1993.
- REID, M. B.; SHOJI, T.; MOODY, M. R.; ENTMAN, M. L. Reactive oxygen in skeletal muscle II. Extracellular release of free radical. *Journal of Applied Physiology*, v. 73, p. 1805 – 1809, 1992.
- REISER, P. J.; KLINE, W. O.; VAGHY, P. A. Induction of neural type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation *in vivo*. *Journal of Applied Physiology*, v. 82, p. 1250-1255, 1997.

- REYK, D. M. V.; KING, N. J. C.; DINAUER, M. C.; HUNT, N. H. The intracellular oxidation of 2',7'-Dichlorofluorescein in murine T lymphocytes. *Free Radical & Biology and Medicine*, v. 30(1), p. 82 – 88, 2001.
- ROYALL, J. A.; ISCHIROPOULOS, H. Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 302(2), p. 348-355, 1993.
- RYAN, T. C.; WEIL, G. J.; NEWBURGER, P. E.; HAUGLAND, R.; SIMONS, E. R. Measurement of superoxide release in the phagovacuoles of immune complex-stimulated human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, v. 130, p. 223 – 233, 1990.
- SATOH, T.; NUMAKAWA, T.; ABIRU, Y.; YAMAGATA, T.; ISHIKAWA, Y.; ENOKIDO, Y.; HATANAKA, H. Production of reactive oxygen species and release of L-glutamate during superoxide anion-induced cell death of cerebellar granule neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 70, p. 316-324, 1998.
- SIMONSEN, L., BULOW, J.; MADSEN, J. Adipose tissue metabolism in humans determined by vein catheterization and microdialysis techniques. *American Journal Physiology*, v. 266, p. E357-E365, 1994.
- SPECIALE, C., UNGERSTEDT, U.; SCHWARCZ, R. Effect of kynurenine loading on quinolinic acid production in the rat: studies *in vitro* and *in vivo*. *Life Science*, v. 43, p. 777-786, 1988.
- SZEJDA, P.; PARCE, J. W.; SEEDS, M. S.; BASS, D. A. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Journal of Immunology*, v. 133(6), p. 3303 – 3307, 1984.

- TATLA, S.; WOODHEAD, V.; FOREMAN, J. C.; CHAIN, B. M. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radical & Biology Medicine*, v. 26, p. 14 – 24, 1999.
- TIDBALL, J. G.; LAVERGNE E.; LAU, K. S.; SPENCER, M. J.; STULL, J. T.; WEHLING, M. Mechanical loading regulates NOS expression and activity in developing and adult skeletal muscle. *American Journal Physiology*, v. 275(44), p. C260-C266, 1998.
- UNGERSTEDT, U. Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *Journal of International Medicine*, v. 230, p. 365-373, 1991.
- VOYTA, J. C.; VIA, D. P.; BUTTERFIELD, C. E.; ZETTER, B. R. Identification and isolation of endothelial cells based on their increase uptake of acetylate-low density lipoprotein. *Journal of Cell Biology*, v. 99, p. 2034 – 2040, 1984.
- WAGNER, P. D. Skeletal muscle angiogenesis. A possible role for hypoxia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 502, p. 21-38, 2001.
- WAGNER, R. C.; MATTHEWS, M. A. The isolation and culture of capillary endothelium from epididymal fat. *Microvascular Research*, v. 10, p. 286 – 297, 1975.
- WOJTASZEWSKI, J. F. P.; HANSEN, B. F.; URSO, B., RICHTER, E. A. Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v. 81(4), p. 1501-1509, 1996.
- WOLIN, M. S.; HINTZE, T. H.; SHEN, W.; MOHAZZAB, H.; XIE, Y. W. Involvement of reactive oxygen and nitrogen species in signaling mechanisms that control tissue respiration in muscle. *Biochemical Society Transactions*, v. 25, p. 934-939, 1997.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, v. 74, p. 139 - 161, 1994.

ZHU, H.; BANNENBERG, G. L.; MOLDEUS, P.; SHERTZER, H. G. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. *Archives of Toxicology*, v. 68, p. 582 - 587, 1994.

ZUO, L.; CHRISTOFI, F. L.; WRIGHT, V. P.; LIU, C. Y.; MEROLA, A. J.; BERLINER, L. J.; CLANTON, T. L. Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *American Journal Physiology*. v. 279, p. C1058-C1066, 2000.

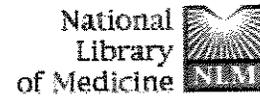
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O CURSO DE DOUTORADO:

Publicações em revistas:

- **HSP72 AS A COMPLEMENT PROTECTION AGAINST EXERCISE OXIDATIVE STRESS IN SOLEUS MUSCLE OF RATS.** Marcus B. Smolka; Claudio C. Zoppi; Armindo A. Alves; Leonardo; R. Silveira, Sergio Marangoni, Lúcia Pereira da Silva, José C. Novello, Denise V. Macedo. *American Journal Physiology*, 279 (5): R1539-R1545, 2000.

- **FORMATION OF HYDROGEN PEROXIDE AND NITRIC OXIDE IN RAT SKELETAL MUSCLE CELLS DURING CONTRACTIONS.** Leonardo R. Silveira, Lúcia P. da Silva, Carsten Juel, Ylva Hellsten. Submetido a publicação na revista *Free Radical in Biology and Medicine*, Novembro de 2002.

- **MONITORING OF INTERSTITIAL HYDROGEN PEROXIDE DURING MUSCLE CONTRACTIONS IN VIVO BY MICRODIALYSIS.** Leonardo R. Silveira, Lúcia P. da Silva, Carsten Juel, Ylva Hellsten. Em forma de manuscrito.



PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM
Search PubMed for [] Go Clear
Limits Preview/Index History Clipboard Details
About Entrez
Display Abstract Show: 20 Sort Send to Text

Text Version
Entrez PubMed
Overview
Help | FAQ
Tutorial
New/Noteworthy
E-Utilities

PubMed Services
Journals Database
MeSH Browser
Single Citation
Matcher
Batch Citation Matcher
Clinical Queries
LinkOut
Cubby

Related Resources
Order Documents
NLM Gateway
TOXNET
Consumer Health
Clinical Alerts
ClinicalTrials.gov
PubMed Central

Privacy Policy

1: Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000 Nov;279(5):R1539-45

Related Article
List

FREE full-text article at
ajr.physiology.org

HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats.

Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, Novello JC, Macedo DV.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Sao Paulo 13083 - 970, Brazil.

Given the potential of reactive oxygen species to damage intracellular proteins during subsequent bouts of muscle contractions, it was suggested that, when this production exceeds the antioxidant capacity, the preexisting antioxidant pathways may be complemented by the synthesis of the defense mechanism represented by heat shock proteins (HSPs), stress proteins with the function of repair and maintaining protein folding. To test this hypothesis, we analyzed reactive carbonyl derivatives in plasma and the expression of HSP72 and activities of enzymes from the oxidative and antioxidant defense systems in the soleus muscle of sedentary rats and rats trained by two protocols: continuous and intermittent. We analyzed all three groups at rest and 2 h after acute exercise. After 8 wk of training, the animals from both groups clearly demonstrated higher resistance to exercise. Both trained groups showed significantly higher citrate synthase, catalase, and glutathione reductase activities than the control group ($P < 0.01$). After acute exercise, catalase and glutathione reductase activities significantly decreased ($P < 0.01$) and plasma reactive carbonyl derivatives significantly increased ($P < 0.05$) in the sedentary group, suggesting an oxidative-stress condition as responsible for exhaustion in this group. Finally, after acute exercise, the induction of HSP72 expression occurred only in the sedentary group, suggesting that HSP72 acts as a complementary protective mechanism in exercise-induced oxidative stress.

PMID: 11049834 [PubMed - indexed for MEDLINE]



No Messenger você conversa com a galera e fica de olho no seu e-mail.

Search the



Home

Inbox

Compose

Contacts

Options Help

leooss@hotmail.com

Free Newsletters | MSN Featured Offers | Find Message

Hotmail

Free Nev
MSN Fea
Find Mes
Reminde
Directori

Save Address(es) Block

Previous Next | Close

From: "FRBM-Newton, Ed. Office (ELS)" <E.FRBM-Newton@elsevier.com>

To: 'Leonardo Silveira' <leooss@hotmail.com>

Subject: RE: Information

Date: Tue, 29 Oct 2002 13:09:27 -0000

Reply Reply All Forward Delete Put in Folder...

Printer Friendly Version

MSN W

MSN Fra
MSN Ger
MSN Ind
MSN Ital
MSN Jap
MSN Kor
TlMSN
MSN UK
YupiMSN
More MS

Dr. Silveria:

We received the manuscript on October 17th and the manuscript number is FRBM OC 110482. An acknowledgement was emailed to the corresponding author Dr. Hellsten.

Thank you

Sara Wilder
Elsevier Science
275 Washington Street
Newton, MA 02458 USA
617-630-2152

-----Original Message-----

From: Leonardo Silveira [mailto:leooss@hotmail.com]
Sent: Tuesday, October 29, 2002 7:34 AM
To: us_frm@elsevier.com
Subject: Information

Editorial Secretariat of Free Radical Biology & Medicine

Please, let me know if FRBM received our manuscript entitled "Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions" submitted on october 10, 2000.

Thanks in advance

Yours sincerely,

Leonardo R. Silveira

Unlimited Internet access -- and 2 months free! Try MSN.
<http://resourcecenter.msn.com/access/plans/2monthsfree.asp>

Reply Reply All Forward Delete Put in Folder...

Previous Next | Close

Publicações em congressos:

ANALYSIS OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS DURING COMPETITION.

C.C. Zoppi, L.R. Silveira, A.A. Alves, L. Pereira-da-Silva and D.V.Macedo. American College of Sports and Medicine (ACSM) 45 th Annual Meeting, Orlando U.S.A., 1998.

CINÉTICA DE REMOÇÃO DO LACTATO SANGUÍNEO E SUA CORRELAÇÃO COM O LIMAR ANAERÓBIO EM FUNDISTAS E FISICULTURISTAS.

L.R. Silveira; C.C. Zoppi; Davini, R; Leitão, R; Macedo, D.V. XXI Simpósio Internacional de Ciências do Esporte. CELAFISCS - São Paulo, 1998.

BLOOD ANTIOXIDANT ENZYMES ADAPTATIONS AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS STATUS DURING ENDURANCE AND INTERMITTENT TRAINING.

C.C. Zoppi, L.R. Silveira, A.A. Alves, L. Pereira-da-Silva and D.V.Macedo. Submetido ao American College of Sports and Medicine (ACSM) 46 th Annual Meeting, Seattle U.S.A., 1999.

ANÁLISES DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E ADAPTAÇÃO AERÓBIA DURANTE TREINAMENTO PRÉ-COMPETIÇÃO EM ATLETAS DE FUTEBOL DE CAMPO.

Alves, A. A.; Zoppi, C.C.; Silveira, L.R.; Pereira-da-Silva, L. and Macedo, D.V. Submetido a IXX Reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental - FESBE - Caxambú MG, 1999.

PROPOSTA DE UMA NOVA TECNOLOGIA DE AJUSTE DE TREINAMENTO APLICADA DURANTE O PERÍODO PRÉ-COMPETITIVO NO TIME DE FUTEBOL JUNIORES DO CORINTHIANS.

A.A. Alves; C.C. Zoppi; L.R. Silveira; Rocha, L.G.; Pirmentel, C.; L. Pereira-da-silva and D.V. Macedo. Depto de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE). 25 - 28 Agosto de 1999, Caxambú - MG, Brasil.

OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN HORSE. Gondim F., Silveira L. R., Pereira-da-Silva L., Macedo D.V. Biochemistry Department, Biology Institute, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

CESMAS 2000, Conference on Equine Sports Medicine and Science of the Elite Show Jumping Horse. Messina and Taormina - Sicily, Italy - May 12th - 16th, 2000.

CINÉTICA DA REMOÇÃO DO LACTATO EM ATLETAS FUNDISTAS E FISIOCULTURISTAS. Davini¹, R.; Silveira, L. R.² ¹ Depto Ciências da Saúde UNIMEP, Piracicaba SP e ² Depto de Fisiologia e Biofísica, UNICAMP, Campinas SP. Congresso de Iniciação Científica - UNIMEP/CNPq. 05 - 09 de Outubro de 1999.

ENDURANCE AND INTERMITENT TRAINING-INDUCED ADAPTATIONS ON MUSCLE AND BLOOD OXIDATIVE AND ANTIOXIDANT ENZYMES. Zoppi C. C., Alves, A.A., Silveira L. R., and Macedo, D.V. Livro de resumos da XXIXa Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Caxambu, MG, Brasil, S-33, 2000.

KINETICS OF PLASMA BIOMARKERS OF OXIDATIVE DAMAGE AND MUSCULAR LESION LEVEL AFTER A BOUT OF EXHAUSTIVE EXERCISE. Silveira L. R., Alves, A.A., Siqueira M.M. and Macedo, D.V. Livro de resumos da XXIXa Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Caxambu, MG, Brasil, S-32, 2000.

STANDARDIZATION OF THE BN-PAGE AND HISTOCHEMICAL STAINING FOR COMPLEXES I AND IV OF THE ELECTRON-TRANSPORT CHAIN IN RAT SKELETAL MUSCLES. MOLNA A.M., Alves, A.A., Silveira L. R., Pereira da Silva, L., Dabenni-Salla F. and Macedo, D.V. Livro de resumos da XXIXa Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Caxambu, MG, Brasil, K-96, 2000.

**OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN BLOOD AND SOLEUS MUSCLE
AFTER A BOUT OF EXHAUSTING EXERCISE.** M. M. Siqueira, A. A. Alves, L. R.
Silveira, L. Pereira-da-Silva, DV Macedo. *Med. Sic. Sports Exercise* 33: res. 1230, 2001.
